

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien

THÈSE présentée par :
Amandine ROUX

soutenue le : **7 novembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Synthèse et fonctionnalisation de bispidines
pour la complexation du ^{64}Cu en vue
d'applications en imagerie médicale par
tomographie à émission de positrons et en
radiothérapie**

THÈSE dirigée par :

Dr CHARBONNIERE Loïc

Directeur de thèse, CNRS Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr CHAMBRON Jean-Claude

Rapporteur externe, Université de Bourgogne

Prof. TRIPIER Raphaël

Rapporteur externe, Université de Brest

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr EL HABIRI Mourad

Examineur, Université de Strasbourg

Dr HUCLIER Sandrine

Examineur, Université de Nantes

Dr NONAT Aline

Co-encadrante, CNRS Strasbourg

Dr BRANDEL Jérémy

Invité, CNRS Strasbourg

A mes parents,

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Loïc Charbonnière, pour m'avoir acceptée en thèse et de m'avoir fait confiance pour ce sujet. Je le remercie pour son encadrement durant ces trois années, son dynamisme, sa motivation et la transmission de son savoir. Je le remercie également pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès qui m'ont permis d'échanger avec la communauté scientifique.

J'exprime ma profonde gratitude envers ma co-encadrante de thèse, le Docteur Aline Nonat qui m'a épaulée et guidée pendant toute la durée de cette thèse. Sa gentillesse, sa patience et son enthousiasme m'ont permis de toujours garder le moral même dans les moments où les résultats se faisaient attendre...

Je tiens également à remercier le Professeur Raphaël Tripier, le Docteur Jean-Claude Chambron et le Docteur Sandrine Huclier d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse ; ainsi que le Docteur Mourad El Habiri, que je remercie également pour le temps consacré aux études électrochimiques.

Je te tiens à exprimer ma profonde gratitude envers le Docteur Jérémy Brandel pour m'avoir encadré lors de mes études physico-chimiques. Merci pour ta disponibilité et pour le temps passé à la compréhension de mes résultats ! Je remercie également Véronique et Sylvia pour leur aide et leurs conseils de chimistes analyticiennes.

Je remercie le Docteur Carlos Platas-Iglesias pour les calculs DFT, le Professeur Laurence Sabatier pour les spectres de masse Maldé-Tof, le Docteur Franck Camerel pour les structures cristallographiques, les Docteurs Ali Ouadi et Patrice Marchand pour les essais de complexation au ^{99m}Tc et Michel Schmitt pour les RMN à température variable.

Cette aventure m'a également permis de rencontrer plein de personnes qui ont accompagné mon quotidien durant ces trois années et avec qui j'ai eu l'occasion de partager de bons moments comme les repas inter-culturels ou les échanges de cadeaux surprises à Noël. Cécilie, merci pour ta bonne humeur, le mot du jour et de m'avoir fait partager ton expérience de l'enseignement. Zouhair, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Pascale, merci pour le mot du jour et ta gaieté. Je remercie également Alexandre, le Mcgyver de l'équipe, Katia, avec qui j'ai pris plaisir à partager le labo (et ses chansons), Sabah, avec qui j'ai pu avoir de nombreuses discussions sur la chimie mais pas seulement, Raphaël, à qui je souhaite une bonne continuation

dans le monde merveilleux des bispidines!, Claudia, pour son court mais sympathique séjour parmi nous, Sophie, pour tous les moments partagés, Thanh Thao, pour sa motivation sans faille et son dynamisme, Tao, Patrick, Parastoo, Marion, Anne, Sylvie ainsi que tous les autres personnes que j'ai pu côtoyées pendant cette thèse.

Merci à Mohamadou pour ces imitations hors-pair, son humour à toute épreuve et sa vision de la vie tellement unique !

J'adresse une pensée particulière à Akram, avec lequel nous nous sommes soutenus mutuellement pendant trois ans, avec qui j'ai passé de bons moments et à qui je souhaite le meilleur pour la suite !

Je remercie également mes amis qui m'ont soutenue et changé les idées quand il le fallait : Camille, Micka, Aurélien, Aubérie et Vincent (mes co-poulets !), Victoire et Marjolaine, ainsi que ma belle-famille et notamment mon filleul Kylian, qui fut un petit rayon de bonheur au milieu de cette thèse.

Je tiens à remercier particulièrement ma famille et notamment mes parents, qui m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même et à voir plus loin à chaque obstacle. Je les remercie de m'avoir donné le goût d'apprendre et de m'avoir soutenu pendant ses longues années d'étude.

Enfin, je remercie celui qui m'a apporté son plus grand soutien durant cette thèse, qui m'a supportée (surtout à la fin...), qui m'a encouragée et re-boosté quand il le fallait, et surtout qui s'est engagé dans cette grande aventure de la vie à mes côtés, mon mari, Jean-Baptiste. Et merci d'avance pour notre futur qui nous attend dans quelques mois...

« Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme. »

Antoine Laurent de Lavoisier (1743-1794)

Sommaire

Chapitre I : Introduction	2
1. Tomographie par Emission de Positrons.....	1
a) Principe.....	1
b) Radionucléides.....	1
c) Production des radioéléments.....	3
d) Production du cuivre 64.....	4
2. Chimie de coordination du cuivre	5
a) Propriétés de coordination	5
b) Propriétés spectroscopiques.....	6
3. Chélatants BiFonctionnels (CBFs).....	8
a) Entité de complexation	8
b) Activation et ciblage d'un motif biologique.....	11
4. Ligands de type bispidine.....	12
a) Historique et stéréochimie	12
b) Etude bibliographique.....	16
c) Applications des bispidones à la complexation d'ions métalliques	29
d) Complexation du cuivre.....	42
5. Conclusion.....	51
Chapitre II : Synthèse de ligands pentadentates de type bispidine	61
1. Ligands cibles.....	61
2. Synthèse des précurseurs.....	62
a) Synthèse du précurseur P ₁	62
b) Synthèse du précurseur P ₂	65
c) Synthèse du précurseur P ₃	67
3. Synthèse des bispidones	69

a) Synthèse du ligand L ¹	69
b) Synthèse du ligand L ²⁶	72
c) Synthèse du ligand L ⁴	73
d) Synthèse du ligand L ⁷	75
4. Optimisation de la stabilité et de la solubilité des bispidones.....	77
a) Synthèse du ligand L ³	77
b) Synthèse du ligand L ⁶	79
c) Synthèse du ligand L ⁹	80
5. Caractérisation des ligands par RMN.....	82
6. Conclusion.....	87
Chapitre III : Etudes structurales et physico-chimiques.....	91
1. Etudes structurales des complexes de zinc(II)	93
a) Synthèse et caractérisation des complexes	93
b) Structure cristallographique.....	99
2. Etudes physicochimiques	101
a) Propriétés acido-basiques des ligands L ³ et L ⁹	101
b) Propriétés de complexation des ligands L ³ et L ⁹ pour des métaux divalents	110
c) Etudes électrochimiques	124
3. Conclusion.....	131
Chapitre IV : Fonctionnalisation des bispidines et couplage	137
1. Fonctionnalisation par couplage peptidique sur le ligand L ⁵	137
2. Chélatant BiFonctionnel dérivé de la lysine	139
a) Synthèse.....	139
b) Caractérisation des complexes.....	145
3. Couplage au ligand Biotine	148
4. Insertion d'une fonction réactive, le maléimide.....	150
5. Synthèse et caractérisation d'une sonde bimodale	153

6. Propriétés de complexation au Technétium 99m	160
7. Autre voie de fonctionnalisation : alkylation de l'alcool tertiaire.....	161
8. Conclusion.....	168
Chapitre V : Synthèse de ligands bispidines de plus haute denticité et de cages tricycliques	173
1. Ligands pour la complexation des lanthanides	173
a) Généralités sur les lanthanides	173
b) Précurseurs.....	174
c) Ligands	179
2. Cages tricycliques	182
a) Précurseur P ₆	183
b) Bispidines	183
3. Conclusion.....	192
Chapitre VI : Conclusion et perspectives	196
Chapitre VII : Partie expérimentale	201
Abréviations	237
Publications et communications.....	239

Chapitre I : Introduction

1. Tomographie par Emission de Positrons

a) Principe

La tomographie par émission de positrons (TEP) est une technique basée sur l'utilisation d'un atome radioactif émetteur de positrons. Lors de sa désintégration, celui-ci va émettre un rayonnement β^+ (positron). Le principe de détection repose sur la rencontre de cette particule β^+ avec un électron présent dans le corps (Figure 1. 1).

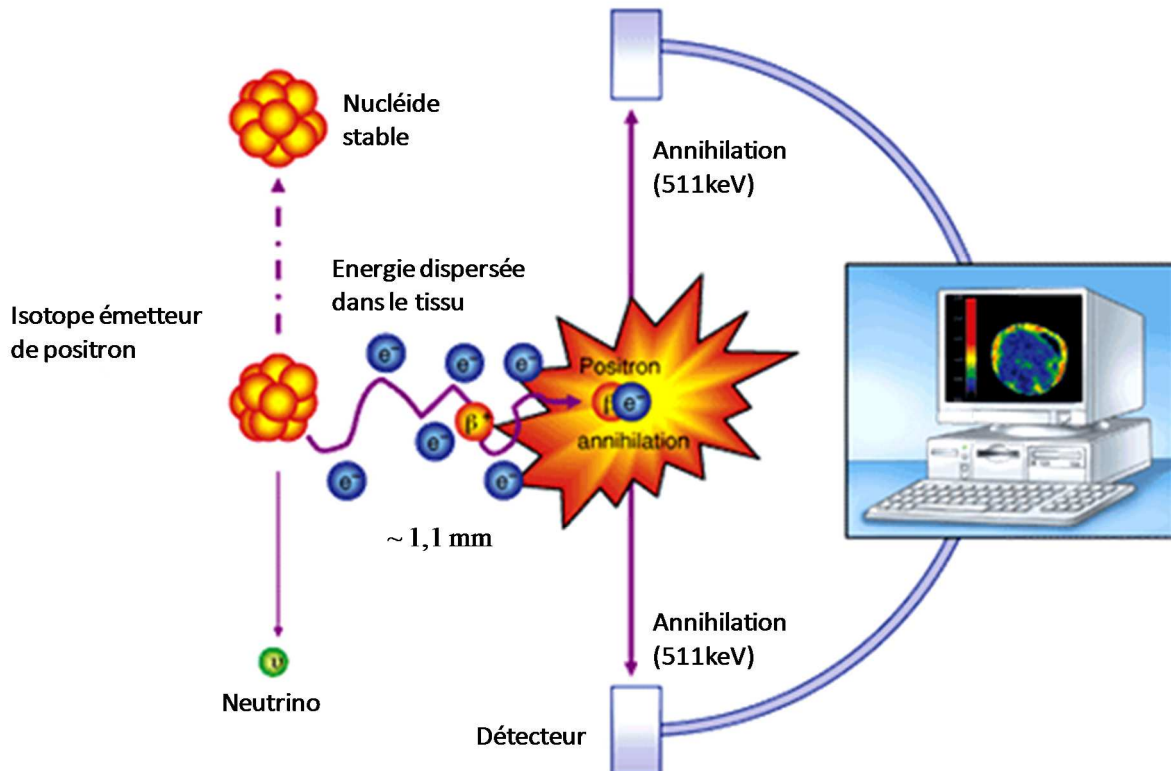


Figure 1. 1: Principe de la Tomographie par Emission de Positrons.

Lorsque les deux particules se rencontrent, il se produit un phénomène d'annihilation et la création de deux photons gamma de directions opposées, d'énergie 511 keV. Ces deux rayonnements γ peuvent alors être détectés par une caméra TEP qui permet la reconstitution d'une image tridimensionnelle. Les principaux avantages de cette technique d'imagerie sont sa sensibilité ($\sim 10^{-12}$ M) ainsi que sa résolution (2-4 mm).¹

b) Radionucléides

Les premiers radioéléments utilisés dans le cadre de l'imagerie TEP sont l'oxygène 15 (^{15}O), l'azote 13 (^{13}N) et le carbone 11 (^{11}C). Ceux-ci ont cependant l'inconvénient de posséder un temps de demi-vie très court, respectivement de 2, 10 et 20 minutes. Il est donc nécessaire d'avoir un cyclotron à proximité du lieu d'étude ainsi qu'une synthèse radiochimique rapide

afin de les utiliser de manière optimale. Plus récemment, de nouveaux radioisotopes ont été produits, comme le fluor 18 (^{18}F). Celui-ci possède un temps de demi-vie de 109 minutes² et peut être incorporé par fluoration nucléophile ou électrophile.³

Le fluor 18 est, à ce jour, le radioisotope le plus utilisé en clinique. Le radio pharmaceutique émetteur de positrons le plus utilisé actuellement est le 2- ^{18}F fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG)^{4,5} (Figure 1. 2).

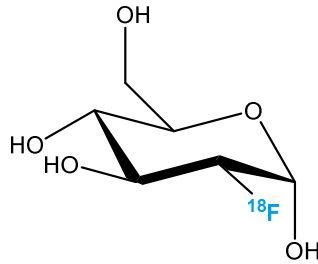


Figure 1. 2: Structure chimique du ^{18}F FDG.

Actuellement, de nombreuses équipes de recherche travaillent sur la production de nouveaux radioéléments ainsi que sur le développement de nouveaux radiotraceurs. Les principaux radioéléments sont listés ci-dessous (Tableau 1. 1).

Emetteurs de positron	Temps de demi-vie	Energie des principaux β^+ (keV)	Intensité des principaux β^+ (%)
^{18}F	109,7 min	634	100
^{68}Ga	1,13 h	1899	87,9
^{64}Cu	12,7 h	653	17,4
^{76}Br	16,2 h	871	6,3
^{86}Y	14,7 h	1221	11,9
^{89}Zr	78,4 h	902	22,7

Tableau 1. 1: Exemples de radioéléments utilisés en imagerie TEP.

Ils peuvent être introduits directement dans la synthèse du radiopharmaceutique ou complexés par celui-ci. D'autre part, il est possible de coupler l'imagerie TEP avec d'autres techniques d'imagerie médicale complémentaires afin d'élargir son champ d'application. En particulier, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) permet d'avoir une bonne résolution spatiale afin de faire de l'imagerie fonctionnelle au niveau clinique, et la luminescence permet, au niveau préclinique, de s'affranchir des contraintes temporelles (études histologiques possibles) dans le cadre de l'imagerie cellulaire.

c) Production des radioéléments

La production des radioéléments se fait via des cyclotrons, des générateurs d'isotopes ou des centrales nucléaires. Suivant le temps de demi-vie du radionucléide cible, la production ainsi que la livraison doivent être adaptées. Dans le cas du cuivre 64, c'est le cyclotron qui est utilisé pour la production.

Un cyclotron désigne un accélérateur de particules circulaire. Il a été inventé par Ernest Orlando Lawrence en 1931.⁶ Le principe repose sur l'introduction de particules électriquement chargées de hautes énergies (1 à 100 MeV) entre deux demi-cylindres (« dees ») entre lesquels sont présents un champ électrique, provenant d'une différence de potentiel d'énergie, ainsi qu'un champ magnétique. Les particules sont alors dirigées vers l'un des deux demi-cylindres. Lorsque celles-ci se retrouvent à l'intérieur, seul le champ magnétique subsiste. Ce dernier va alors imposer une trajectoire circulaire aux particules. Grâce à l'inversion de la différence de potentiel, lorsque les particules sont à l'intersection des deux demi-cylindres, celles-ci peuvent accélérer de nouveau jusqu'à atteindre l'énergie adéquate. A ce moment là, elles se retrouvent expulsées vers la cible pour donner lieu à une réaction nucléaire (Figure 1. 3).

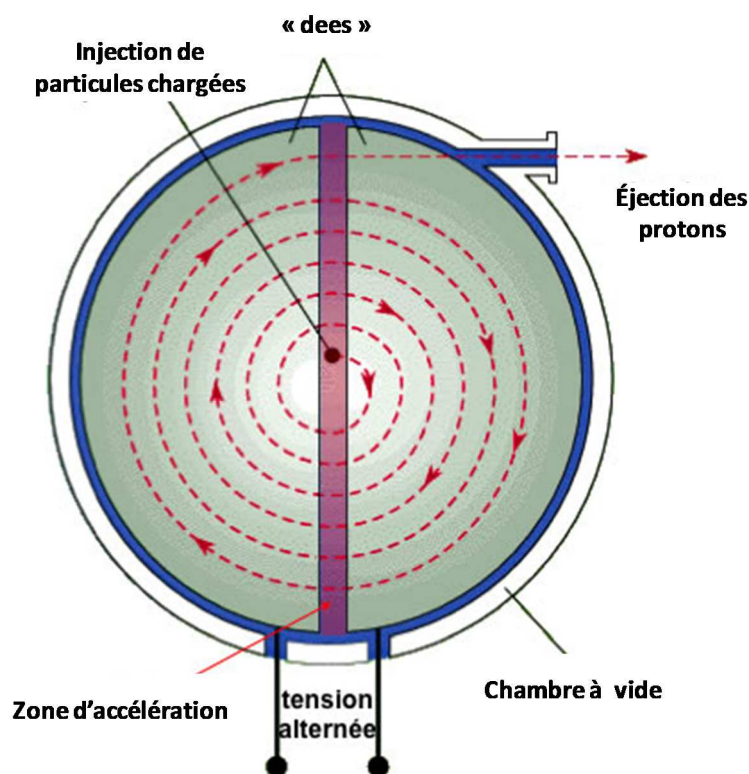


Figure 1. 3: Principe de fonctionnement du cyclotron.

L'obtention du radioélément se fait via la réaction nucléaire suivante : ${}^A_Z X(x, y) {}^{A'}_{Z'} Y'$ avec ${}^A_Z X$, x , y et ${}^{A'}_{Z'} Y'$ désignant respectivement l'élément cible, la particule incidente, la particule émise et l'élément produit par la réaction.

d) Production du cuivre 64

Le développement de nouveaux chélatants pour le cuivre 64 est actuellement en plein essor, même si aucun radiopharmaceutique cuivré n'est encore utilisé cliniquement.¹ Le premier intérêt du cuivre 64 est son temps de demi-vie, $t_{1/2} = 12,7$ h, bien supérieur à celui du fluor 18. Un temps de demi-vie aussi élevé va permettre l'étude de processus biologiques plus lents qui ne pouvaient être observés auparavant, en particulier des processus de reconnaissance de type antigène/anticorps marqué. D'autre part, ce radionucléide présente l'intérêt de deux désintégrations différentes (Schéma 1. 1).

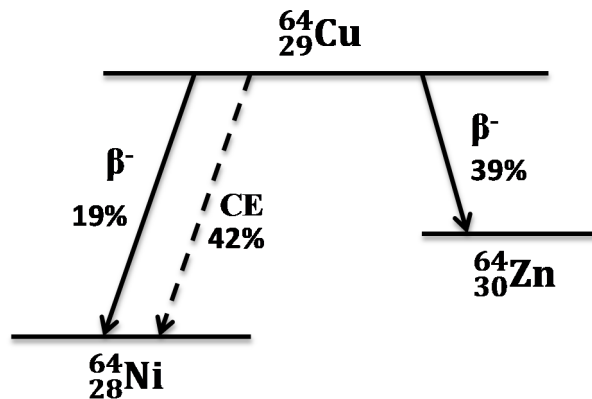


Schéma 1. 1: Schéma de désintégration du cuivre 64.

La désintégration en ${}^{64}\text{Ni}$ donne une particule β^+ mais il y a également production d'une particule β^- qui conduit au ${}^{64}\text{Zn}$. De plus, le cuivre 67, qui possède la même chimie que le cuivre 64, est un émetteur de particule β^- . Cela en fait donc un isotope de choix dans le cadre de la radiothérapie.

Le cuivre 64 est principalement produit par bombardement de protons sur une cible de nickel 64. Les réactions nucléaires produites sont les suivantes : ${}^{64}\text{Ni}(p,n) {}^{64}\text{Cu}$ et ${}^{64}\text{Ni}(d,2n) {}^{64}\text{Cu}$ avec p : proton, n : neutron et d : deutéron.^{7,8} Suite à la production du ${}^{64}\text{Cu}$, une étape de purification est nécessaire. Celle-ci s'effectue sur une colonne chromatographique échangeuse d'ions afin de séparer le cuivre 64 des autres métaux comme le cobalt ou le nickel.^{9,10}

2. Chimie de coordination du cuivre

Le cuivre est un métal qui possède une configuration électronique $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$. Son numéro atomique est 29, et il est situé dans la colonne 11 et dans la 4^{ème} période de la classification périodique. Dû à ses similitudes avec l'or et l'argent, dont il partage la même colonne, le cuivre peut être qualifié de métal semi-noble.

Le cuivre appartient à la famille des métaux de transition car il existe à des degrés d'oxydation où sa sous-couche d est incomplète. Le cuivre en solution aqueuse peut exister sous trois états d'oxydation différents (+1 à +3).¹¹ On peut également le trouver aux degrés d'oxydation -1, 0 et +4. Dans le cas de l'imagerie TEP, l'état d'oxydation utilisé est le cuivre(II). Ceci correspond à la forme la plus abondante du cuivre dans le sang. Le cuivre(I) est présent dans les cellules à cause du fort potentiel réducteur de celles-ci. Ce potentiel est dû à la présence de réducteurs biologiques tels que le glutathion. Le cuivre(II) possède une configuration d^9 , et est considéré comme un métal frontière plutôt mou selon la théorie de Pearson.¹² Celui-ci a de l'affinité pour les ligands de type amines, imines et pour les ligands bidentates de type bipyridines. Les géométries adoptées par le métal sont des géométries plan carré, pyramide trigonale, pyramide à base carrée ou encore octaédrique distordue.¹³

De plus, des distorsions de type Jahn-Teller sont fréquemment observées sous la forme d'une élongation axiale ou d'une compression tétragonale.¹⁴ Lorsque le cuivre(II) est complexé, une espèce colorée et paramagnétique est obtenue, due à la configuration électronique du métal.¹⁵

a) Propriétés de coordination

La structure d^9 du cuivre(II) favorise l'obtention de multiples géométries par distorsion de type Jahn-Teller de la géométrie octaédrique des complexes $(t_{2g})^6 (e_g)^3$. Les complexes de cuivre(II) peuvent subir cette distorsion le long de l'un des axes de symétrie quaternaire (axe z). Ceci entraîne une diminution de la répulsion électrostatique entre le doublet libre du ligand et les électrons du métal central, une levée de dégénérescence orbitale $(e_g)^3$ et enfin une diminution de l'énergie totale du complexe. Cette déformation de la géométrie octaédrique provoque une élongation des distances métal-ligand, et peut parfois induire des raccourcissements de cette liaison.

Dans le cas de l'espèce $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, c'est l'effet Jahn-Teller qui est responsable de la distorsion de la géométrie. En effet, une déformation de la géométrie octaédrique est observée en solution ainsi qu'à l'état cristallin¹⁶ (Figure 1. 4).

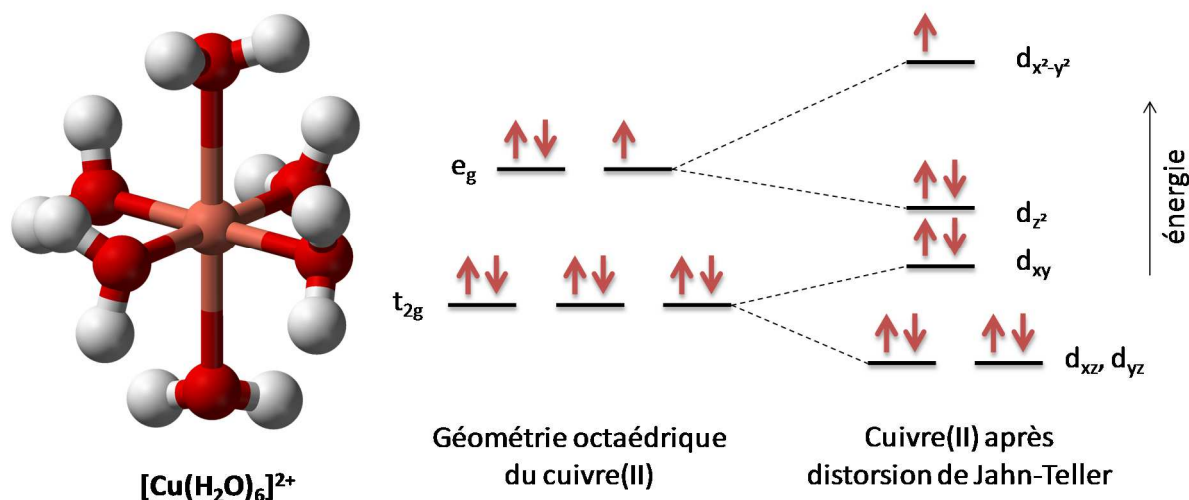


Figure 1. 4: Structure du complexe hexaaquacuire(II) à l'état solide.

A l'état solide, les quatre liaisons équatoriales ont une distance de 2 Å tandis que les deux liaisons Cu-O axiales valent 2,45 Å ; le cation $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ adopte dans ce cas une géométrie octaédrique avec un caractère rhombique.¹⁷

L'ion cuivre(II) forme des complexes dont le nombre de coordination peut varier de quatre à six (Tableau 1. 2).

Nombre de coordination	Géométrie
4	Tétraédrique Plan carrée
5	Bipyramide à base triangulaire (trigonale) Pyramide à base carrée
6	Octaédrique Octaédrique déformé

Tableau 1. 2: Nombre de coordination et géométrie des complexes de cuivre(II).¹⁸

Contrairement aux autres métaux de transition, les distorsions adoptées par les complexes de cuivre(II) sont très importantes. Dans le cas des géométries pentacoordinées, une élongation et une déformation du plan trigonal sont possibles. La géométrie bipyramide trigonale peut donc se déformer vers une pyramide à base carrée.

b) Propriétés spectroscopiques

Les propriétés spectroscopiques des complexes de cuivre(II) vont varier selon la géométrie adoptée par celui-ci.¹⁹ Les complexes de cuivre(II) présentent des transitions d-d, celles-ci sont dues à l'absorption d'un photon de la lumière visible. La couleur du complexe observée

correspond alors à la couleur complémentaire de la lumière absorbée. Une transition électronique de type d-d correspond à une transition au cours de laquelle un électron passe du niveau t_{2g} au niveau e_g pour une géométrie octaédrique. Ces transitions sont observées à partir de 500 nm jusqu'à l'infrarouge.

Les complexes de cuivre(II) présentent également un autre type de transition, les transferts de charge. Trois types existent : transfert de charge du ligand vers le métal (LMCT), transfert de charge du métal vers le ligand (MLCT) et des transitions internes centrées sur le ligand. Dans le cas des complexes de cuivre(II), ces types de transition sont principalement attribués au transfert de charge du ligand vers le métal et aux transitions internes (bandes d-d). Ces transitions vont permettre de renseigner sur la nature des ligands qui coordinent le cation cuivrique. Celles-ci seront visibles sur une gamme allant de 220 à 2000 nm (Figure 1. 5).

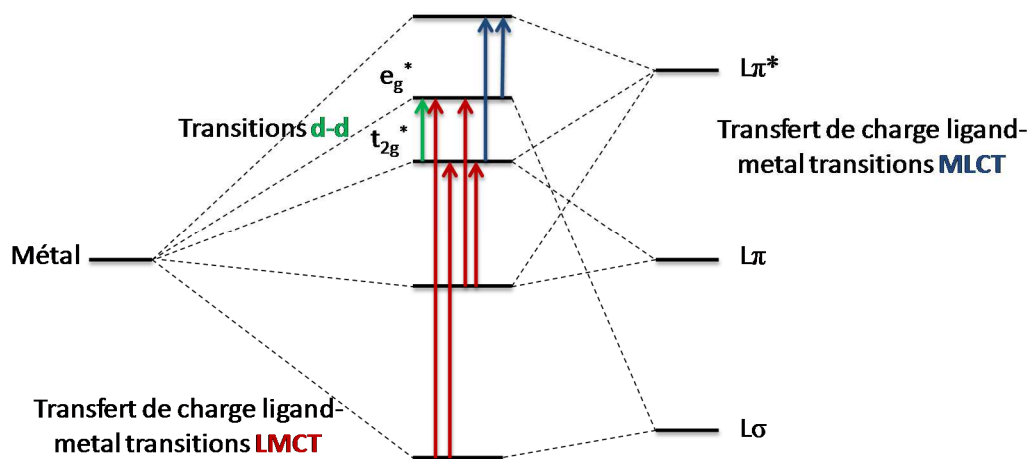


Figure 1. 5: Transitions électroniques observées pour un complexe de cuivre(II).

Parmi toutes ces transitions possibles, seules les transitions d-d centrées sur le métal vont apporter des informations sur la géométrie adoptée par le complexe de cuivre(II). Il existe une corrélation entre les géométries adoptées par les complexes et les énergies de ces transitions d-d²⁰ (Figure 1. 6).

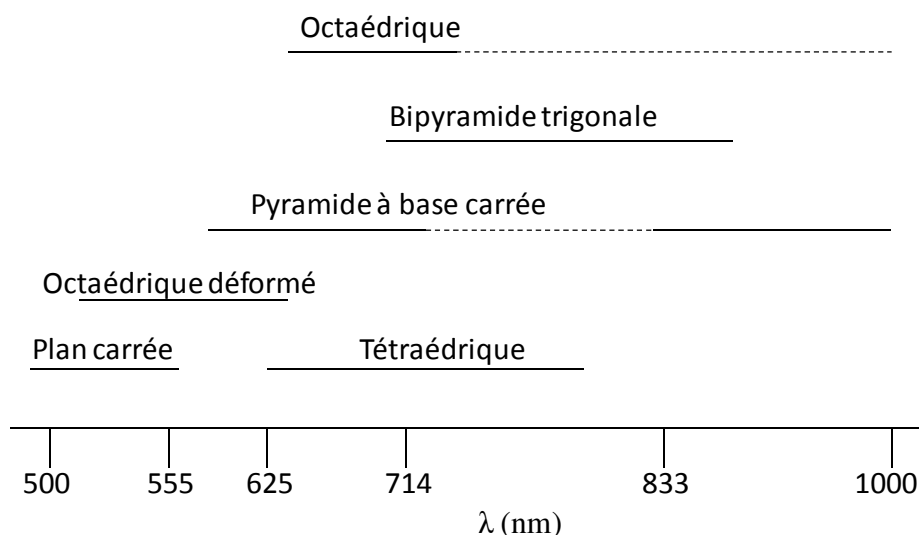


Figure 1. 6: Corrélation entre la longueur d'onde des transitions d-d et la géométrie adoptée par le complexe.

3. Chélatants BiFonctionnels (CBFs)

Dans le cadre de l'imagerie médicale, et notamment de l'imagerie TEP, il est nécessaire de développer des chélatants bifonctionnels (CBFs). Les CBFs sont des molécules contenant deux entités bien distinctes : un site de coordination pour le métal d'intérêt et un élément fonctionnalisant pouvant cibler ou réagir avec un motif biologique (Schéma 1. 2).

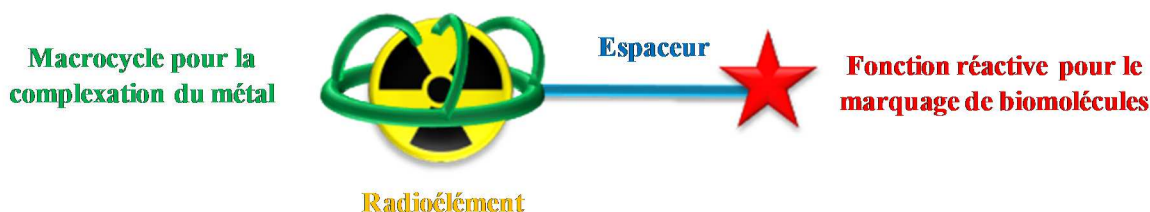


Schéma 1. 2: Schéma général d'un chélatant bifonctionnel basé sur un macrocycle.

Idéalement, le vecteur permet d'effectuer un ciblage au niveau moléculaire permettant d'améliorer significativement la sensibilité de la technique et d'effectuer des diagnostics précoces.

a) Entité de complexation

L'entité de complexation doit présenter certaines caractéristiques indispensables pour son utilisation en imagerie TEP.

La sphère de complexation du chélatant doit posséder des atomes coordinants pour lesquels le métal aura une bonne affinité.¹² Dans le cas du cuivre(II), l'azote et l'oxygène ont été cités précédemment. L'utilisation des ligands macrocycliques a été privilégiée car elle permet d'avoir un effet chélate non-négligeable, permettant d'augmenter la stabilité thermodynamique

ainsi que l'inertie cinétique. Celle-ci est liée à la vitesse de décomplexation du métal. Plus celui-ci mettra du temps à être relargué dans le milieu, plus l'inertie sera importante. Des complexes rigides et préorganisés sont généralement cinétiquement inertes. Cependant, cela est parfois contrebalancé par des cinétiques de complexation lentes.

En effet, la cinétique de complexation joue un rôle primordial, notamment dans le cadre de l'imagerie TEP. Le temps de demi-vie de certains radionucléides étant déjà assez court, il est nécessaire que la formation du complexe se fasse le plus rapidement possible.

Une fois le complexe formé, il est également indispensable de vérifier sa stabilité en milieu réducteur. En effet, en milieu biologique, et notamment dans la cellule, le potentiel réducteur est très élevé et le cuivre(II) peut être réduit en cuivre(I). Ceci ne change pas la nature radioactive du noyau mais le cuivre(I) est souvent beaucoup plus labile que le cuivre(II) car il ne possède pas les mêmes affinités, et peut donc être relargué plus facilement. Des études d'électrochimie sont donc réalisées afin de déterminer le potentiel oxydo-réducteur du couple $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ du complexe et d'évaluer la stabilité du complexe, une fois le cuivre(II) réduit en cuivre(I).

Enfin, il peut être intéressant d'étudier la sélectivité du ligand pour le métal cible vis-à-vis des métaux de transitions voisins. Si le ligand s'avère complexer le métal cible avec une constante globale de complexation de plusieurs ordres de grandeur plus élevée que les autres métaux, il serait possible de s'affranchir de l'étape de purification postproduction du cuivre 64 dans le cas de ces travaux.

De nombreux chélatants pour le cuivre 64 ont été synthétisés ces dernières années, dont quelques exemples sont donnés ci-après (Figure 1. 7). Historiquement, des cycles tels que le cyclam, le DOTA et leurs dérivés ont d'abord été développés avant de nouvelles études sur des synthèses de nouveaux macrocycles tels que no1pa2py, H₂L2 et diamsar. L'ensemble de ces ligands possèdent une ou plusieurs des caractéristiques requises pour la complexation du métal^{21,22,23,24} (Tableau 1. 3).

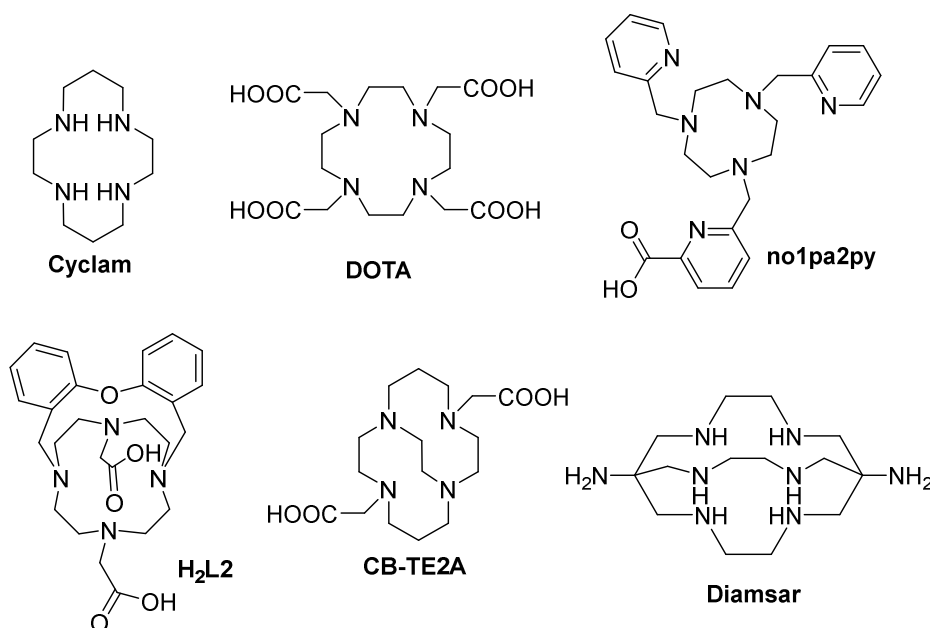


Figure 1. 7: Structures de chélatants macrocycliques pour le cuivre 64.

Ligands	$\log \beta_{ML}$	$t_{1/2}$	E_{red} (mV/ENH)	pCu	pZn
Cyclam	22,7	3,8 min (5M HCl, 90°C)	-480 (irr)	20,8	
DOTA	22,3	<3 min (5M HCl, 90°C)	-740 (irr)		
no1pa2py	20,96	204 min (3M HCl, 90°C)	-518	18,7	14,2
H ₂ L ₂	20,87	30,8 j. (12M HCl, 90°C)	-447, -591 (irr)	12,11	5,06
CB-TE ₂ A		154h (5M HCl, 90°C)	-880		
Diamsar		40h (5M HCl, 90°C)	-900 (irr)		

Tableau 1. 3: Caractéristiques thermodynamiques et cinétiques de quelques chélatants macrocycliques ($pM = -\log [M^{2+}]_{libre}$).

Les exemples cités présentent tous une forte constante de complexation mais leur stabilité en milieu acide est très variable. D'autre part, il est préférable que le système électrochimique soit considéré comme (quasi-)réversible au cas où le milieu biologique possède un potentiel inférieur à celui calculé pour le complexe. Un autre point important est la cinétique de complexation. Or, dans le cas du ligand CB-TE₂A, qui présente une très forte stabilité et un potentiel de réduction très bas, cette cinétique s'avère lente et il est nécessaire de chauffer pour que la complexation soit plus rapide.^{25,26} Ceci n'est pas compatible avec le couplage à des motifs biologiques tels que les anticorps.

b) Activation et ciblage d'un motif biologique

Le motif ciblant, quant à lui, doit pouvoir être introduit sur le chélatant via un espaceur et par des liaisons covalentes, le point principal étant qu'il ne doit pas y avoir d'influence de cette entité sur la bonne complexation du métal. Il est donc nécessaire que la distance entre les deux entités du CBF soit optimisée. Mis à part l'entité de complexation, il est indispensable d'introduire une fonction réactive ou une biomolécule permettant le ciblage d'un motif biologique. De nombreuses voies de fonctionnalisation ont été développées, à partir des fonctions réactives présentes sur les biomolécules¹, notamment la lysine et la cystéine (Figure 1. 8).

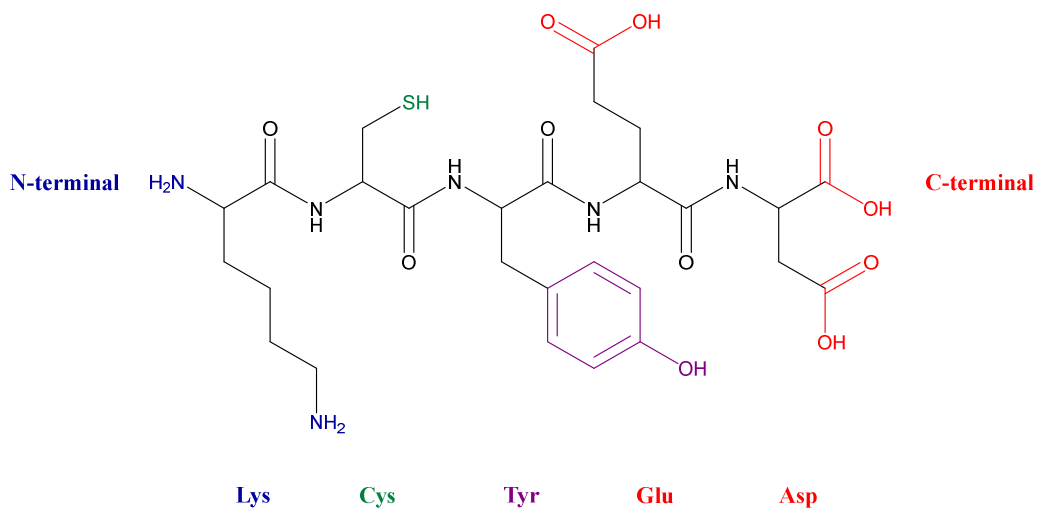


Figure 1. 8: Fonctions réactives des acides aminés présents sur les biomolécules.

Cette fonction réactive pourra réagir avec un espaceur, s'il est nécessaire d'en introduire un, ou directement avec l'entité réactive ciblante. Les voies de réaction les plus courantes décrites dans la littérature sont les suivantes¹ (Schéma 1. 3).

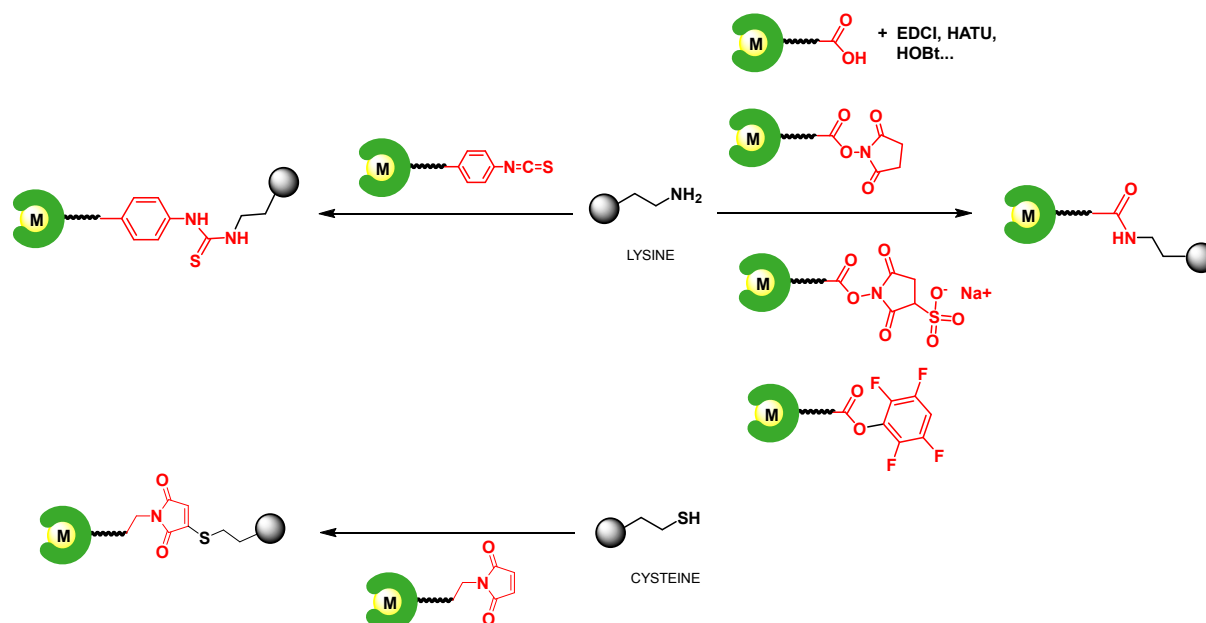


Schéma 1. 3: Exemples de voies de greffage de biomolécules via les fonctions lysine et cystéine.

Toutes ces fonctions réactives et ces voies de fonctionnalisation permettent d'obtenir des chélatants bifonctionnels. Le ciblage par la biomolécule va permettre d'avoir une imagerie précise aux niveaux des tumeurs par exemple, dans le cas de cancers.²⁷

C'est dans ce cadre que le laboratoire a souhaité développer une nouvelle classe de chélatants possédant toutes les caractéristiques nécessaires afin d'obtenir un bon ligand. Les bispindines sont des chélatants peu développés comparé aux ligands de type cyclam et cyclen. Nous allons présenter les travaux déjà réalisés sur ce type de diazabicyclononane et les récentes avancées, que ce soit dans le domaine de la complexation ou encore de la catalyse.

4. Ligands de type bispidine

a) Historique et stéréochimie

Historiquement, les molécules de type bispidine ont été développées dans le cadre de la recherche médicale, et plus particulièrement, pour leurs propriétés analgésiques.^{28,29,30,31,32,33,34}

Cette recherche s'est développée suite à la découverte de la spartéine, diamine chirale naturelle et agent antiarythmique, par Stenhouse en 1851³⁵ (Figure 1. 9).

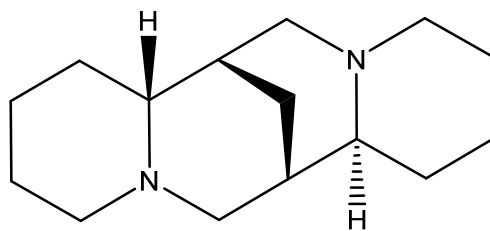


Figure 1. 9: Formule de la spartéine.

Ces diazabicyclononanones sont représentées de manière schématique avec la numérotation usuelle ci-dessous (Figure 1. 10).

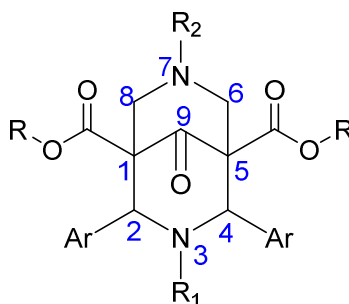


Figure 1. 10: Formule générale des diazabicyclononanones de type bispidines.

De manière générale, un groupement cétone est présent sur l'atome de carbone C9. Deux groupements électroattracteurs tels que des esters sont également présents sur les atomes C1 et C5, et en position C2 et C4, on retrouve des groupements aromatiques, le plus souvent des pyridines.

Cette étude s'est largement développée et c'est l'équipe de Nachtsheim³⁶ en 1996 qui a démontré l'intérêt des ligands de type diazabicyclononanones pour les récepteurs κ -opioïdes. Plus particulièrement, les composés HZ1 (diméthyl 7-méthyl-2,4-di-2-pyridil-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one-1,5-dicarboxylate) et HZ2 (diméthyl 3,7-méthyl-2,4-di-2-pyridil-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one-1,5-dicarboxylate) ont montré une forte affinité et sélectivité envers ces récepteurs^{37,38} (Figure 1. 11).

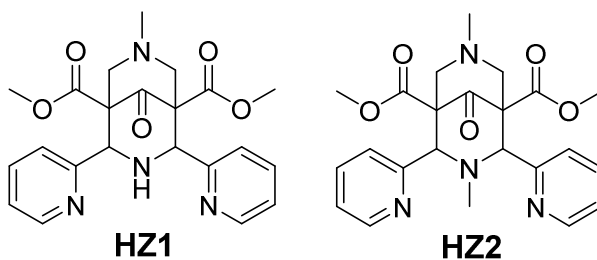


Figure 1. 11: Structures des composés HZ1 et HZ2.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous allons nous limiter à l'étude des bispidines substituées par deux groupements aromatiques en C2 et C4. La synthèse de ces ligands s'effectue selon une double réaction de Mannich (Schéma 1. 4).

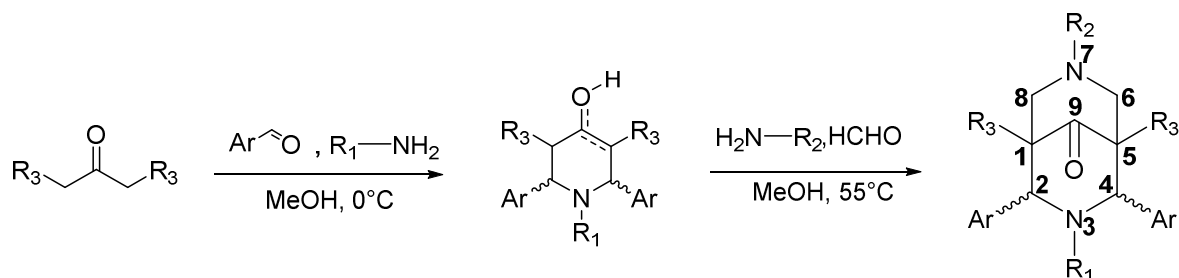


Schéma 1. 4: Synthèse des ligands bispidones.

Les rendements obtenus lors de cette synthèse sont très variables (de 5 à 91% pour la deuxième étape) en fonction des substituants R_1 , R_2 et R_3 . La difficulté vient du contrôle de la stéréochimie. En effet, lors de la première étape, un intermédiaire de type pipéridinone est obtenu sous la forme d'un mélange d'isomères (isomères de configuration et équilibre céto-énolique). Le bicyclic est formé lors de la deuxième étape pour former une molécule de type bispidoné, qui peut adopter l'une des trois conformations : chaise-chaise, bateau-chaise ou chaise-bateau. La forme bateau-bateau n'est en général pas observée (Figure 1. 12).

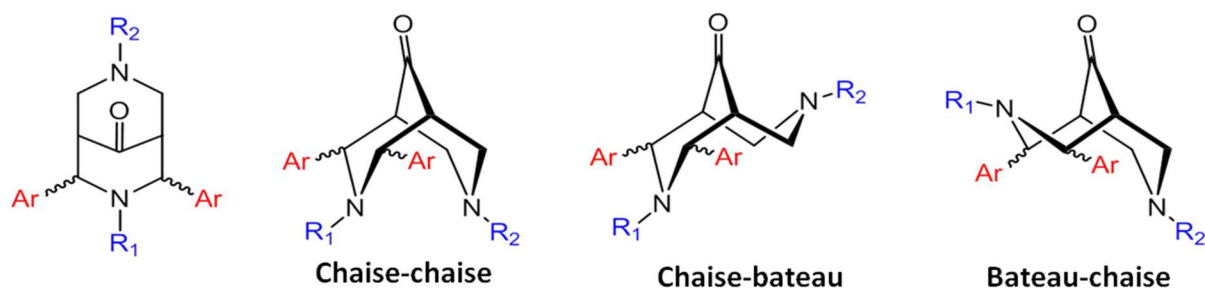


Figure 1. 12: Conformations adoptées par le bicyclic.

La conformation adoptée par le bicyclic va dépendre de plusieurs paramètres. Tout d'abord, l'encombrement stérique des différents substituants présents va influencer l'une ou l'autre conformation. S'il y a des groupements encombrants en position R_1 ou en R_2 , cela peut favoriser le basculement d'un ou des deux cycles en conformation bateau car celle-ci sera plus stable thermodynamiquement.⁴³ Cependant l'encombrement stérique n'est pas le seul facteur déterminant, et des chaînes lipophiles C_6 , C_8 et C_{12} ont notamment pu être introduites sur des bispidines de conformation chaise-chaise.³⁹ En effet, il a été montré que les différentes liaisons hydrogènes présentes dans la structure pouvaient également influencer l'une ou l'autre

configuration.⁴⁰ Le paramètre important dans ce cas là sera la présence ou l'absence d'atomes donneur ou accepteur de liaisons en R₁ ou en R₂.

En plus de ces différentes conformations, les bispidines substituées en position C2 et C4 peuvent présenter différentes configurations, suivant que les motifs aromatiques soient en position axiale ou équatoriale (Figure 1. 13).

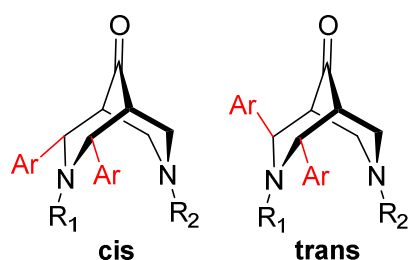


Figure 1. 13: Configurations cis/trans des groupements aromatiques.

Dans le cadre de notre étude, il est nécessaire d'obtenir des bispidines pour lesquelles les groupements aromatiques sont en configuration *cis* afin de complexer le cuivre(II). Le passage d'une configuration à l'autre est possible, en présence de la cétone centrale, par ouverture de cycle due à une réaction de rétro-Mannich^{41,42} (Figure 1. 14).

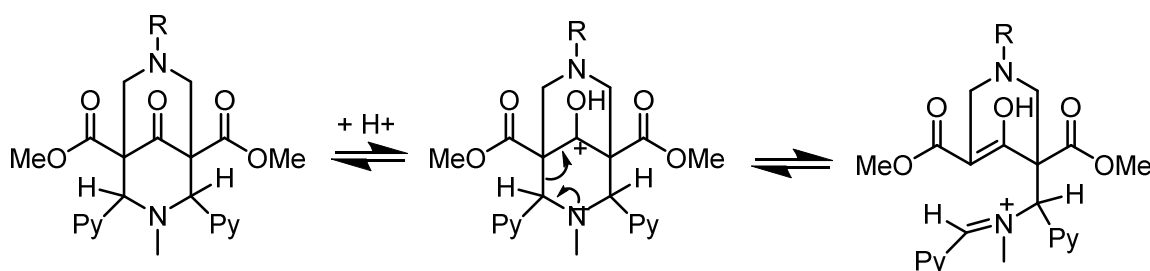


Figure 1. 14 : Processus d'ouverture de cycle des bispidones par rétro-Mannich.

Il peut également y avoir une rotation des groupements aromatiques (dans le cas présenté ici, des pyridines), ajoutant des isomères supplémentaires⁴³ (Figure 1. 15).

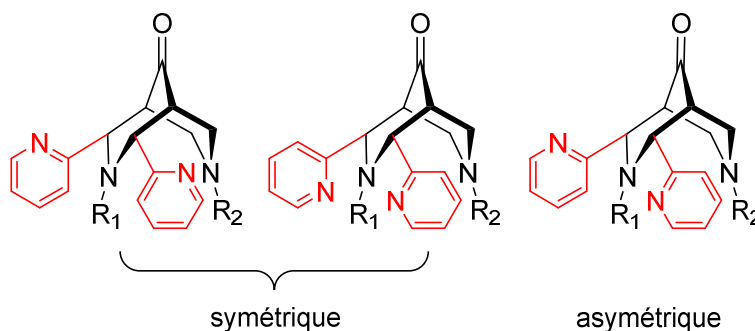


Figure 1. 15: Rotamères obtenus en présence de groupements pyridines.

En effet, l'atome d'azote de la pyridine peut pointer vers le haut de la molécule, c'est-à-dire vers la cétone ou vers le bas, c'est-à-dire vers le groupement R_1 . Toutes ces conformations sont possibles mais pas toujours observables car les pyridines sont en libre rotation et peuvent donc donner des signaux moyennés en RMN. D'autre part, des signaux dédoublés en RMN peuvent être dus à i) une conformation *cis*-asymétrique ou ii) une configuration *trans*. Cette publication présente également la première bispidone caractérisée en conformation bateau-chaise avec les groupements pyridines en configuration *trans* (R_1 = éthyl, propyl, butyl, allyl, R_2 = méthyl).

Pour conclure sur cette première partie, la configuration de ce type de molécule dépend donc de plusieurs paramètres. Suivant l'utilisation souhaitée de ces composés, il va être nécessaire de bien contrôler leur stéréochimie (chap. II). Dans le cas d'utilisation comme analgésiques ou pour la complexation de métaux, il est nécessaire d'obtenir la forme *cis*.⁴⁴

b) Etude bibliographique

Les bispidines sont encore peu connues des groupes de chimie de coordination et leur synthèse reste limitée à un faible nombre d'équipes. Il nous a donc paru intéressant de présenter les différentes molécules qui ont été synthétisées au cours des quarante dernières années.

Historiquement, le groupe de Haller en 1971 a été le premier à développer une famille de bispidones substituées par des groupements hydrocarbures⁴⁵ (Figure 1. 16).

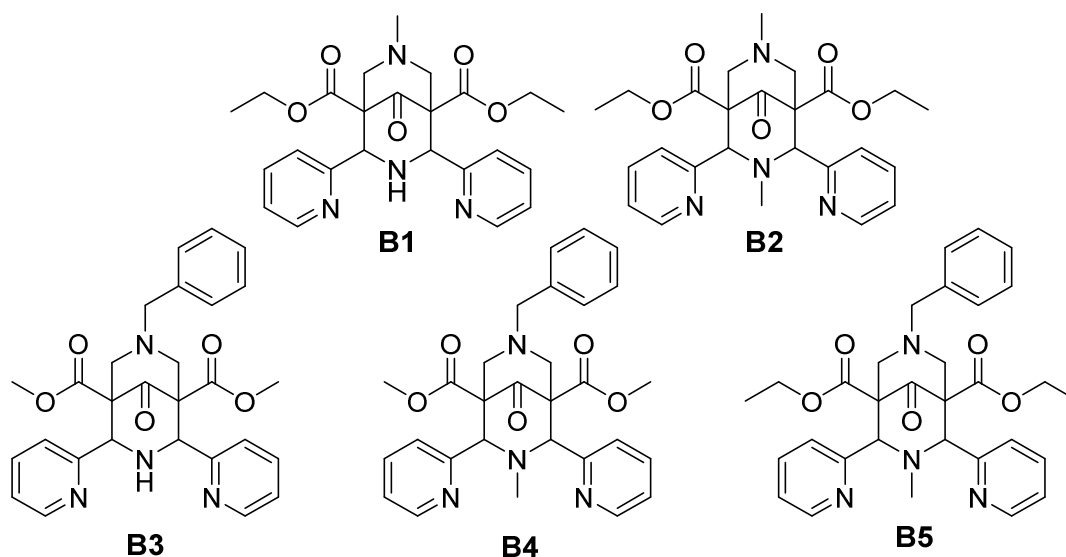


Figure 1. 16: Bispidones synthétisées par Haller et coll.

Les variations présentes entre ces ligands se situent au niveau des esters du bicyclic, et en position R_1 et R_2 .

Un autre des premiers groupes à avoir développé cette thématique est le groupe d'Holzgrabe dans le but médical discuté précédemment. Pour cela, plusieurs bispidines similaires à celles décrites par Haller, ont été synthétisées^{43,46,47} (Figure 1. 17).

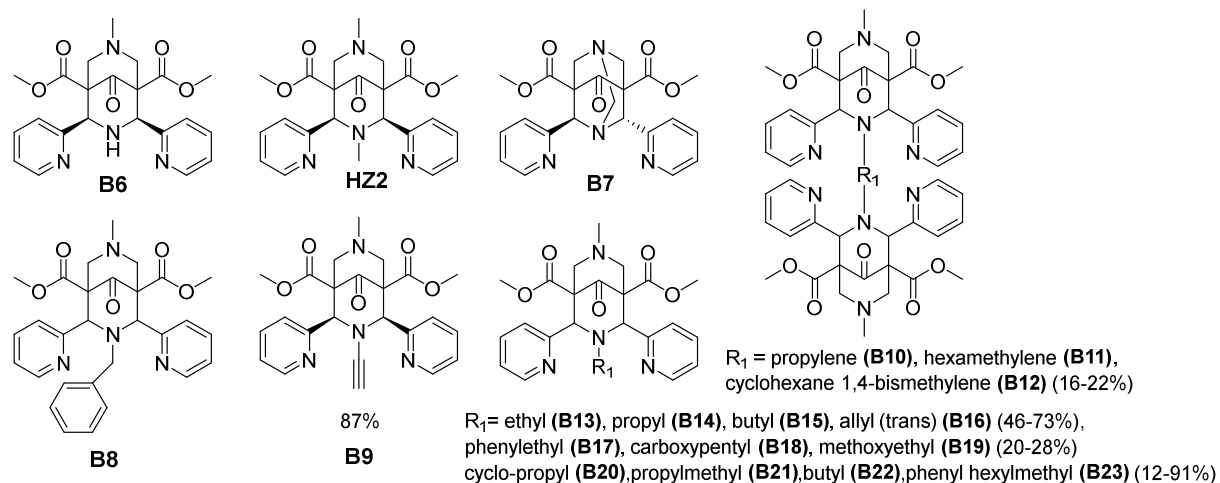






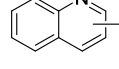
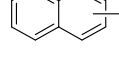



Figure 1. 17: Bispidines obtenues par Holzgrabe et coll. (rendements).

Les substituants introduits en position R_2 correspondent à des hydrocarbures plus ou moins encombrés afin d'étudier l'influence de ces groupements sur la configuration du ligand. En effet, des configurations *cis* et *trans* ont été obtenues, ainsi que des conformations chaise-chaise et bateau-chaise. Il n'est donc pas possible d'introduire n'importe quel groupement en position R_2 sans avoir d'effet sur la stéréochimie de la bispidine.

La même équipe a ensuite proposé une nouvelle famille de ligands possédant divers groupements aromatiques en position C2 et C4, pour étudier leurs interactions envers les récepteurs opioïdes (Tableau 1. 4).⁴⁸

Ligand	Ar	R
B24		a: X= p-F b: X= m-F c: X= o-F R= CH ₃
B25		a: X= p-OH b: X= m-OH e: X= o-OH a, b: R= CH ₃ e: R= C ₂ H ₅
B26		a: X= p-OCH ₃ b: X= m-OCH ₃ R= CH ₃
B27		a: X= p-Cl b: X= m-Cl c: X= o-Cl d: X= 3,4-diCl e: X= p-Cl a-d: R= CH ₃ e: R= C ₂ H ₅
B28		a: X= p-NO ₂ b: X= m-NO ₂ c: X= o-NO ₂ e: X= m-NO ₂ a-c: R= CH ₃ e: R= C ₂ H ₅
B29		a: X= p-CN b: X= m-CN R= CH ₃
B30		a: 2-quinolyl b: 3-quinolyl R= CH ₃
B31		a: 1-naphthyl b: 2-naphthyl R= CH ₃
B32		a: 3-pyridyl b: 4-pyridyl R= CH ₃

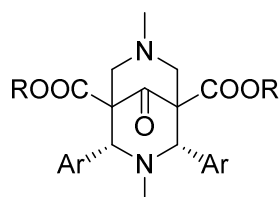
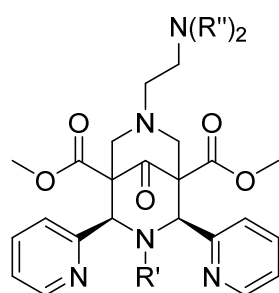


Tableau 1. 4: Ligands synthétisés en vue d'application biologique.

Toujours dans le cadre de substituants apolaires, l'équipe de Sadler a développé en 2008, une série de précurseurs pipéridinones et de ligands bispidonés hydrophobes³⁹ (Figure 1. 18).



R' = CH₃ (**B33**), (CH₂)₅CH₃ (**B34**), (CH₂)₁₁CH₃ (**B35**), (CH₂)₁₇CH₃ (**B36**)

R'' = Me (**B37**), Et (**B38**), iPr (**B39**)

Rendements = 49-70%

Figure 1. 18: Formules des bispidonés hydrophobes développées par Sadler.

Les trois ligands avec R' = CH₃, ont montré l'obtention d'une conformation chaise-chaise avec une configuration *cis* pour les pyridines. Les autres ligands synthétisés n'ont pas pu être cristallisés du fait de la forte hydrophobicité de la chaîne en R' et des précipitations dans le diéthyl éther ont été effectuées pour la purification. Ces molécules ont été obtenues sous forme

d'huile et non de solides. Cependant, les études RMN ont également indiqué une configuration *cis* des groupements pyridines.

En parallèle de ces groupes, la majeure contribution à cette thématique a été faite par le groupe de Comba qui a initié l'utilisation des bispidines pour la complexation des métaux de transition.

i. Ligands mononucléaires

En 2001, son équipe s'est d'abord intéressée aux propriétés du squelette bispidone⁴⁹ (Figure 1. 19).

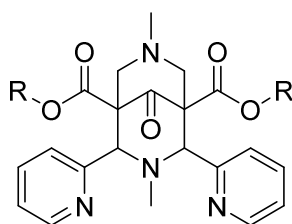


Figure 1. 19: Squelette de type bispidone étudié.

En effet celui-ci est très rigide, ce qui permet une bonne coordination aux métaux et notamment au cuivre(II). Les structures obtenues par RX et celles calculées par DFT ont mis en évidence que le squelette bispidone dispose d'une rigidité et d'une préorganisation naturelle qui fournit une sphère de coordination de type pyramide à base carrée, adaptée à la complexation des métaux de transitions. Ce n'est donc pas le métal qui impose la géométrie finale du complexe mais le ligand.

Un an plus tard, P. Comba a développé une nouvelle famille de ligand, toujours pour la complexation du cuivre, en vue d'étudier leurs propriétés, notamment leur réactivité vis-à-vis de l'oxygène⁵⁰ (Figure 1. 20).

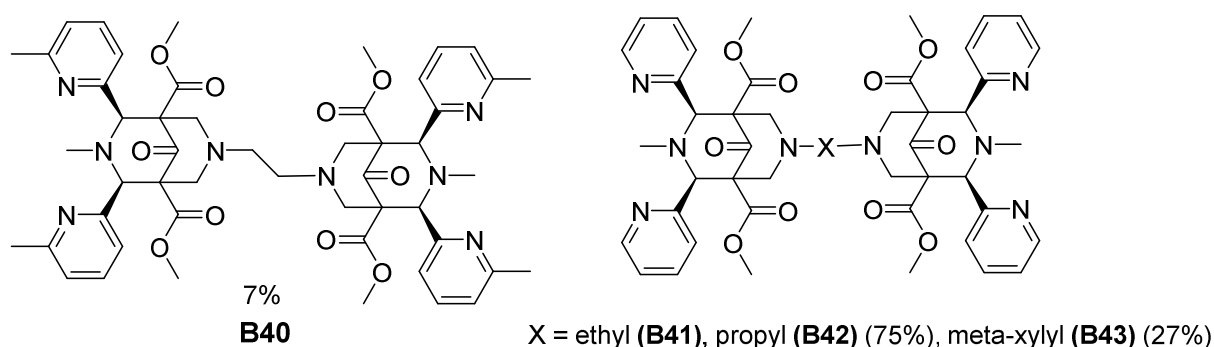


Figure 1. 20: Structures des ligands bispidones pour la complexation du cuivre(II).

Des ligands dimériques ont pu être synthétisés via l'azote N7. Le rendement de certains ligands est meilleur grâce à une optimisation de la synthèse effectuée auparavant.⁴⁶

En parallèle, une autre famille de ligands a été synthétisée pour la formation de complexes de fer⁵¹ (Figure 1. 21). Pour la première fois, les positions R₁ et R₂ sont utilisées pour l'introduction de sites de coordination, permettant d'obtenir des ligands (tétra-), penta- et hexadentate (chap. I/ 4. c)).

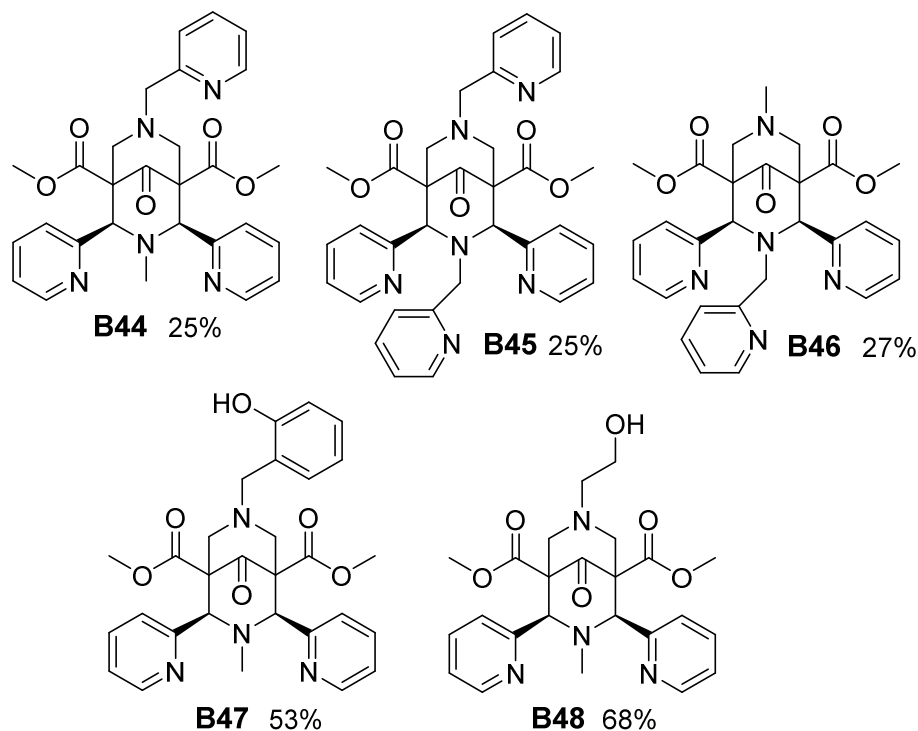


Figure 1. 21: Formules des ligands pour les complexes de fer.

Ces ligands présentent tous une conformation chaise-chaise et une configuration *cis*, les rendements variables ne sont donc pas liés à une différence de stabilité thermodynamique entre les formes *cis* et *trans* mais s'expliquent plutôt par le mode de purification (recristallisation). Cette recristallisation s'effectue essentiellement dans l'éthanol pour ces ligands. Au niveau de la stabilité des ligands, il a été remarqué qu'il est préférable de réduire la cétone et les groupements esters en alcools. Ceci permet d'empêcher le processus de Rétro-Mannich (Figure 1. 14) ainsi que l'hydrolyse en milieu acide ou basique. D'autre part, ces ligands ont montré une bonne stabilité à l'air. Leur rigidité est une nouvelle fois mise en avant car les paramètres structuraux obtenus sont identiques pour tous les ligands décrits.

En 2003, trois nouveaux ligands ont été obtenus en vue d'étudier l'influence de l'hydratation en C9 et de la dimérisation sur la géométrie de la sphère de complexation (chap. I/ 4. d)) (Figure 1. 22).⁵²

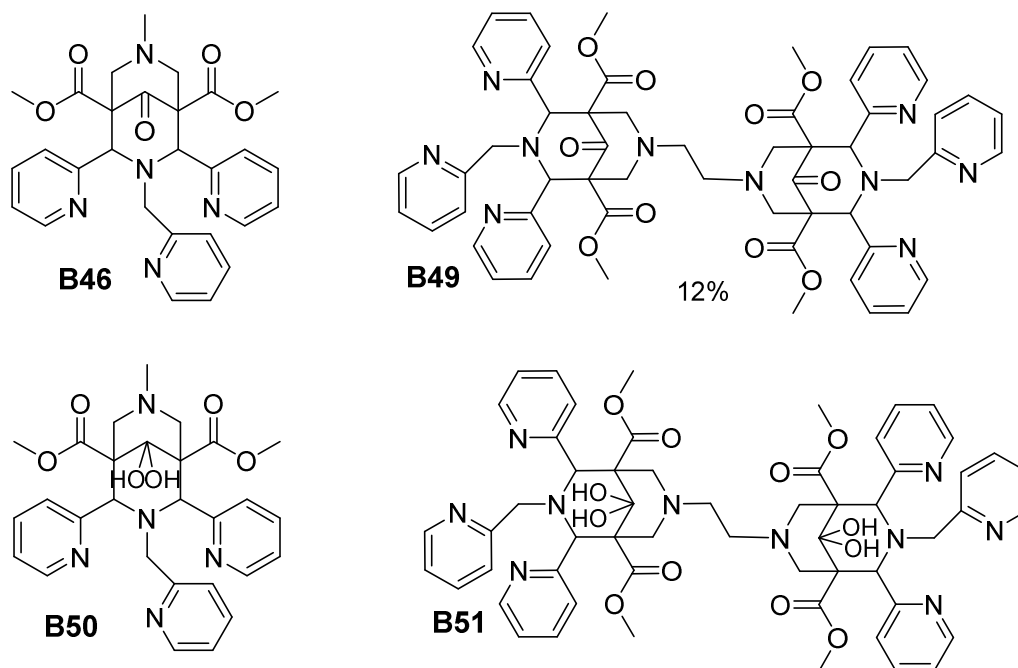


Figure 1. 22: Structures des ligands obtenus pour l'étude d'un minimum d'énergie.

D'autres ligands pour la complexation du fer(III) ont été synthétisés en 2011 (Figure 1. 23).⁵³

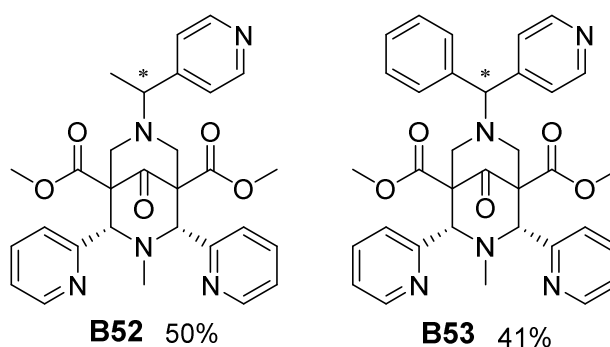


Figure 1. 23: Formules des bispidines chirales.

Ces ligands présentent une conformation chaise-bateau, excepté dans le cas du ligand **B52** protoné qui se trouve dans une conformation chaise-chaise. Due à la présence d'un carbone asymétrique en R₂, ces ligands présentent une flexibilité moins importante que les ligands décrits précédemment.

En 2005, d'autres ligands tétra- et pentadentates ont été obtenus⁵⁴ (Figure 1. 24).

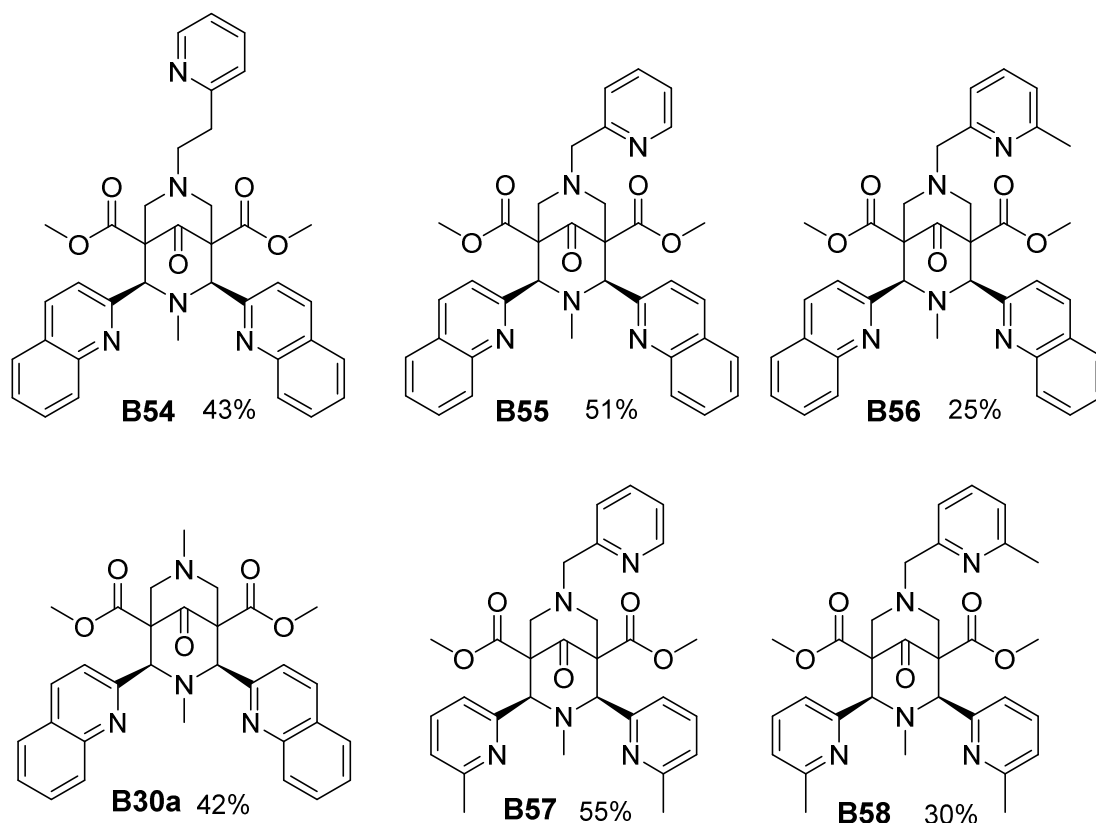


Figure 1. 24: Nouveaux ligands pour la complexation du cuivre(II).

De nouveaux substituants ont été introduits sur le squelette bispidone : la méthylpyridine et la quinoline, afin d'étudier leur influence sur la complexation du métal (chap. I/ 4. d)). Les structures cristallographiques montrent que les substituants sont bien en configuration *cis* malgré leur encombrement stérique (Figure 1. 25).

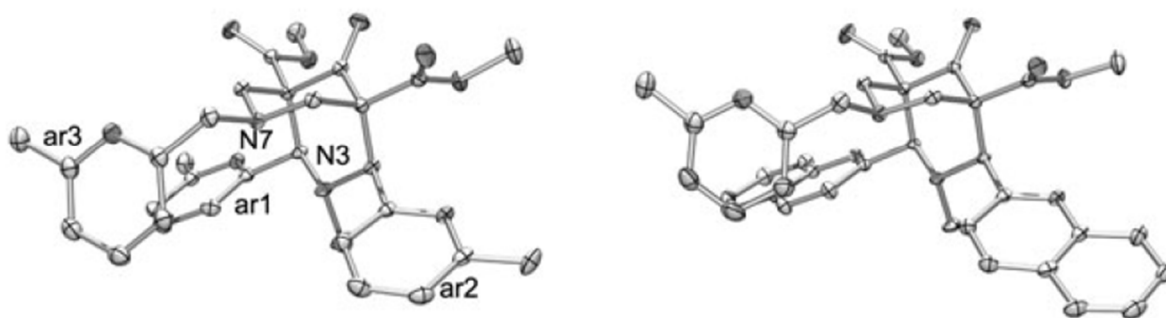


Figure 1. 25: Représentations des structures cristallographiques (ORTEP) de ligands substitués par des méthylpyridines et des quinolines.

Bien que les substituants quinoline et méthylpyridine soient plus encombrants, les ligands obtenus sous la forme *exo-endo* (*trans*) après la synthèse, peuvent évoluer vers la forme la plus stable thermodynamiquement (forme *endo-endo* (*cis*)) en chauffant le milieu après réaction. Les propriétés électroniques de ces deux groupements diffèrent des pyridines non-substituées

(pKa : 2-méthylpyridine, 6.00 ; pyridine, 5.23 et quinoline, 4.90). Les bicycles sont également en conformation chaise-chaise ; la configuration globale du ligand final est donc optimale pour la complexation de l'ion métallique et ceux-ci sont obtenus avec des rendements similaires voir supérieurs à ceux obtenus avec les analogues pyridiniques.

La même année, d'autres ligands ont été étudiés pour leur complexation avec différents cations métalliques⁵⁵ (Figure 1. 26).

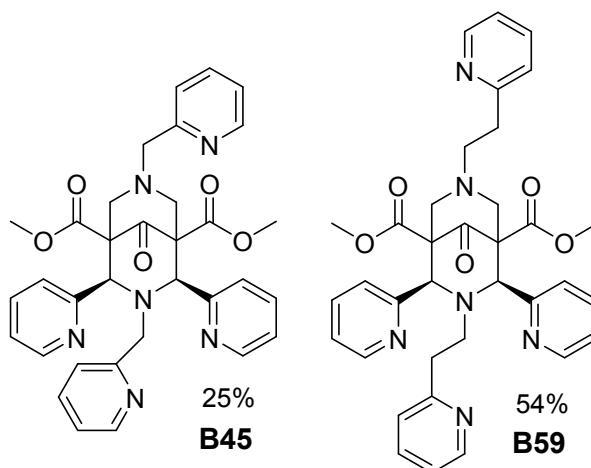


Figure 1. 26: Ligands bis(amine)tétrakis(pyridine).

A l'issue de la réaction, le produit cinétique (configuration *exo-endo*) est obtenu et isomérisé en composé *cis* (thermodynamiquement plus stable), après recristallisation dans l'éthanol. L'obtention du produit cinétique peut s'expliquer par la durée de la réaction qui n'est que de cinq minutes (plusieurs heures en général pour les autres bispidonés). La différence de rendement entre ces deux composés pourrait s'expliquer par la différence de stabilité des deux formes *cis*. En effet, nous avons démontré par des calculs DFT que l'isomère (*endo-endo*) du composé **B45** n'était pas le produit thermodynamique.⁴⁰ Comme expliqué précédemment, la recristallisation dans l'éthanol ou le méthanol est une étape clé pour l'obtention de la molécule souhaitée. En effet, en plus d'être une étape de purification, cela permet d'isomériser le produit dans la configuration *cis* (*endo-endo*) (Figure 1. 27).

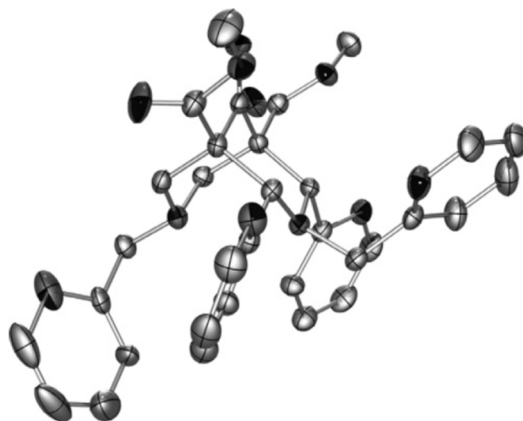


Figure 1. 27: Structure cristallographique ORTEP du ligand bis(amine)tétrakis(pyridine) B45.⁵⁵

En 2008, différents ligands ont été synthétisés dans le but de tester un modèle théorique (LFMM) permettant de prédire les différents isomères qui seront obtenus après complexation avec le cuivre(II) mais également en vue d'utiliser ces ligands comme catalyseurs pour la réaction d'aziridination (Figure 1. 28).^{56,99}

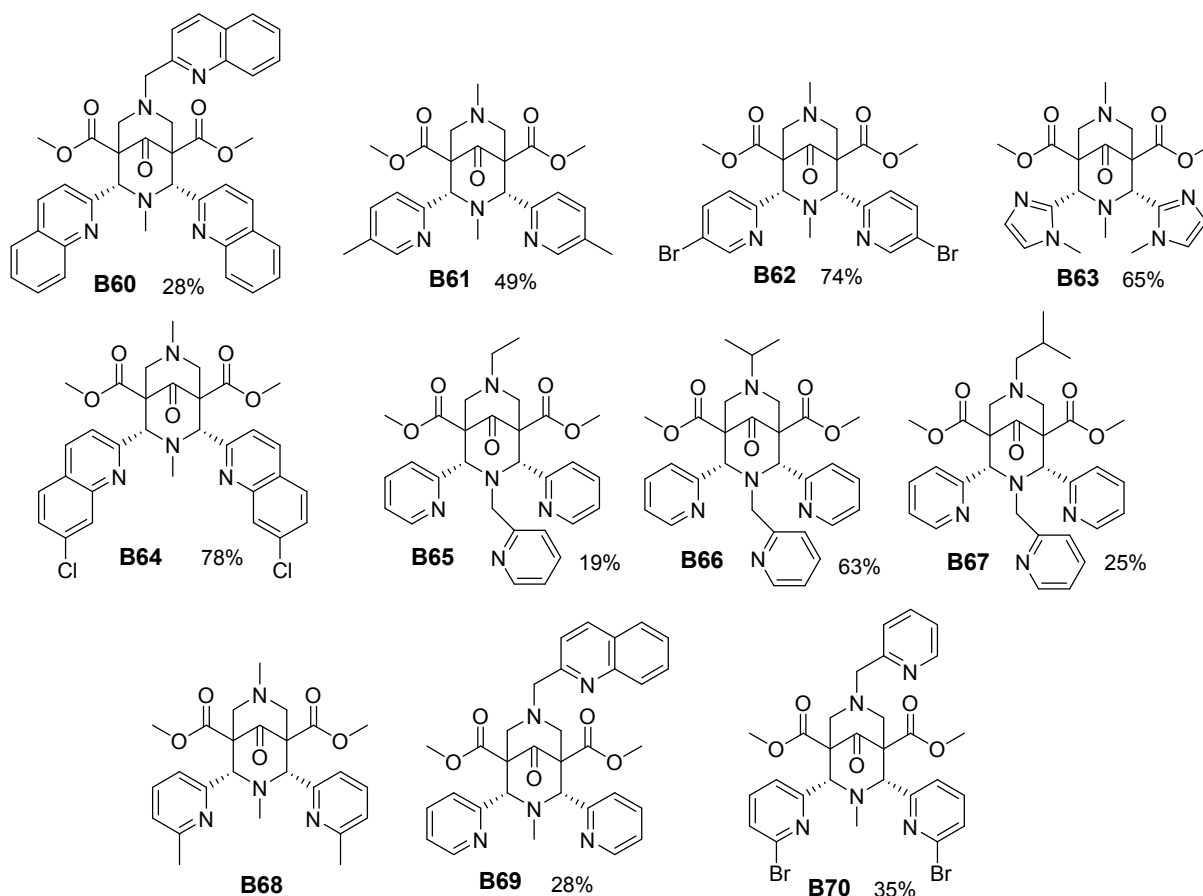


Figure 1. 28: Structures des ligands B60 à B70.

De précédentes études théoriques avaient déjà été effectuées à partir de méthodes DFT et *ab initio* démontrant qu'un seul modèle « classique » n'était pas suffisant pour l'étude des bispidines.⁵⁷

La même année, des bispidines chirales ont été synthétisées pour une application d'oxydation catalytique en présence de palladium (Figure 1. 29).⁵⁸

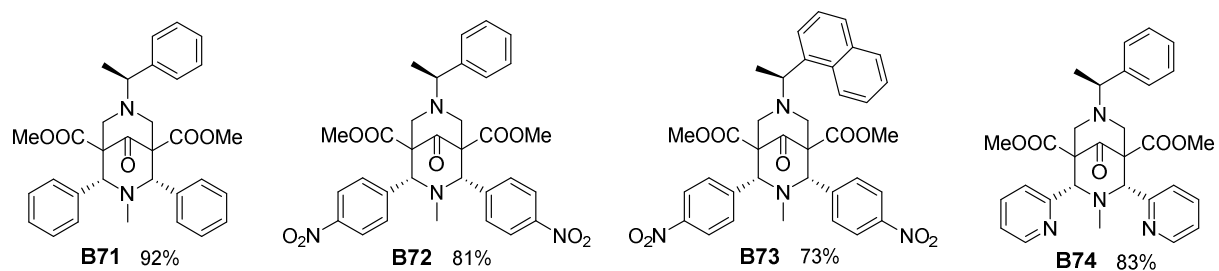


Figure 1. 29: Structures des bispidines chirales B67 à B70.

En 2013, l'équipe de Comba s'est de nouveau intéressée aux complexes de cuivre(II)⁵⁹ (Figure 1. 30).

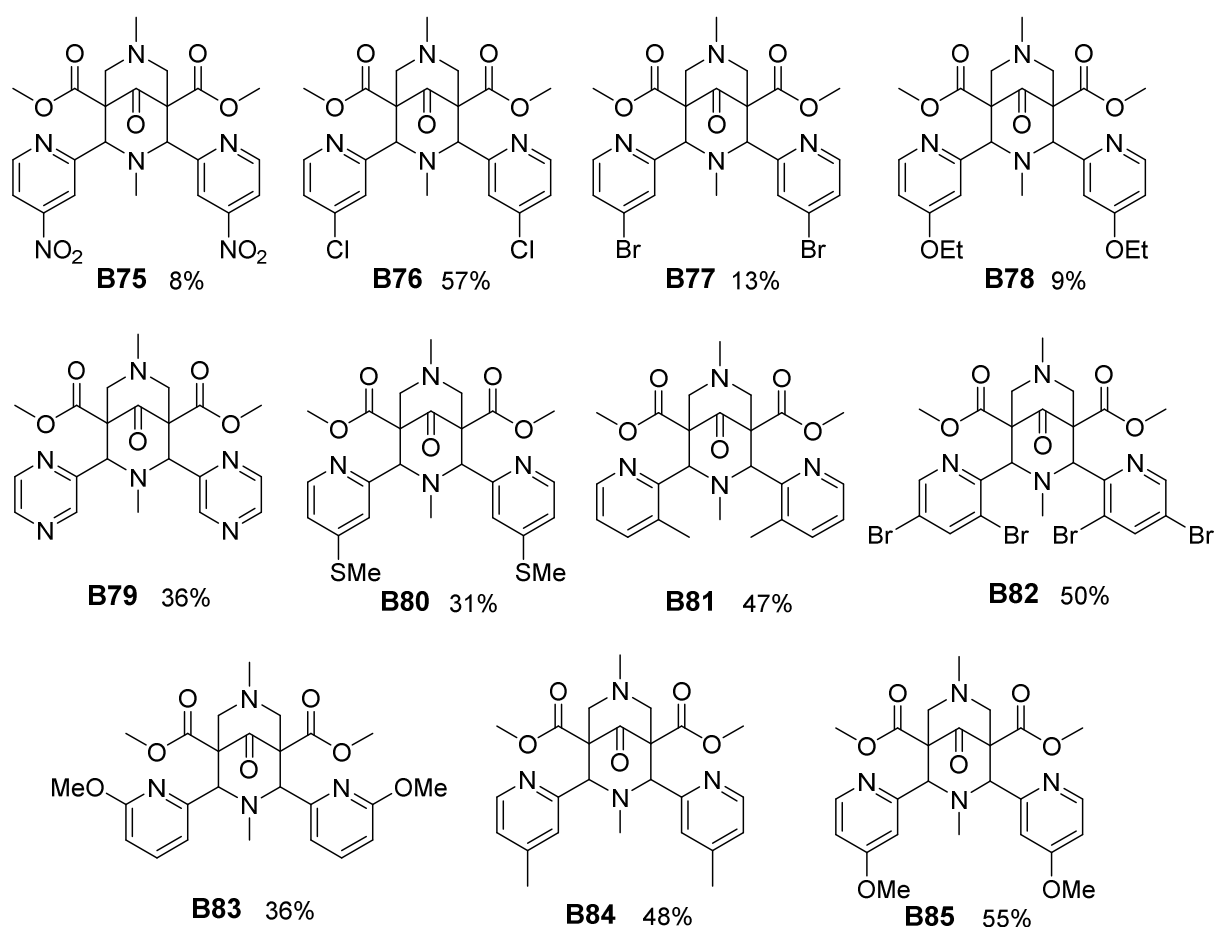


Figure 1. 30: Bispidones tétradentates substituées.

De nouveaux ligands avec différents motifs pyridiniques substitués ou pyrazine ont été synthétisés afin de jouer sur la basicité du groupement pyridine et ainsi d'étudier son influence sur les pKa du ligand (chap. I/ 4. d).

Dans la plupart des cas, les ligands bispidonés ont été isolés sous la configuration chaise-chaise syn, exceptés le ligand pyrazine (chaise-chaise anti), le ligand méthylpyridine (bateau-chaise syn) et le ligand dibromopyridine (bateau-chaise anti). (Figure 1. 31). Cette série illustre bien les différents stéréoisomères qu'il est possible d'obtenir.

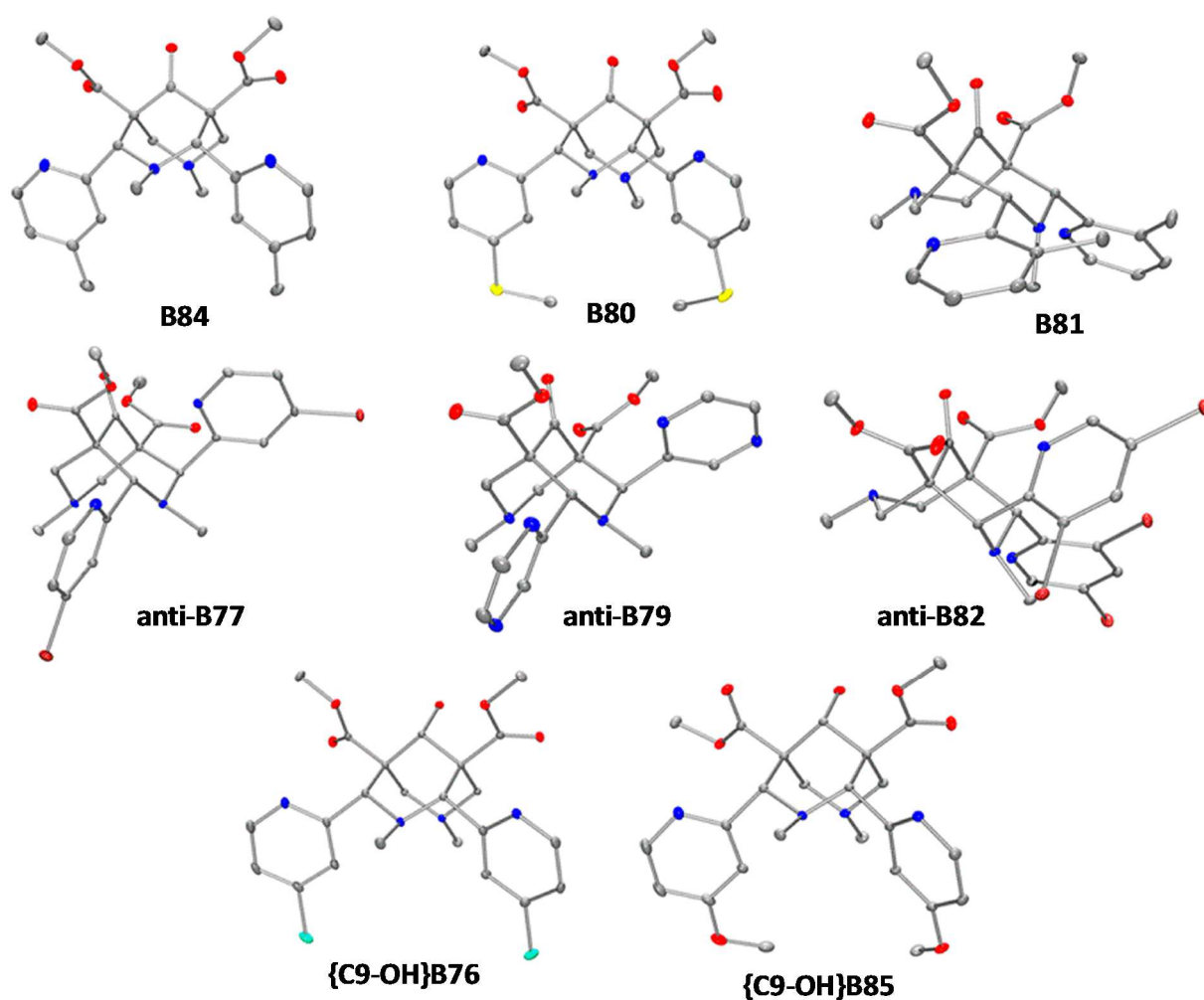


Figure 1. 31: Structures cristallographiques des ligands pyridines substituées et pyrazine, en conformation chaise-chaise (B84, B80, B77, B79, B76 et B85) ou bateau-chaise (B81 et B82).

Dans la conformation chaise-chaise, les groupements pyridinyl sont en position équatoriale (favorable thermodynamiquement) donc la répulsion induite par les doublets non-liants des azotes N3 et N7 a une influence mineure sur cette conformation. Cependant, cette répulsion explique la conformation anti des pyridines, qui pointent alors hors de la cavité. Dans le cas de la conformation bateau-chaise, les substituants forcent l'azote N3 à adopter une géométrie trigonale plane ce qui induit une répulsion plus forte des doublets non-liants des deux azotes.

La même année, des ligands trispyridines ont été synthétisés afin d'étudier la différence de complexation entre des ligands tétra- et pentadentates⁶⁰ (Figure 1. 32).

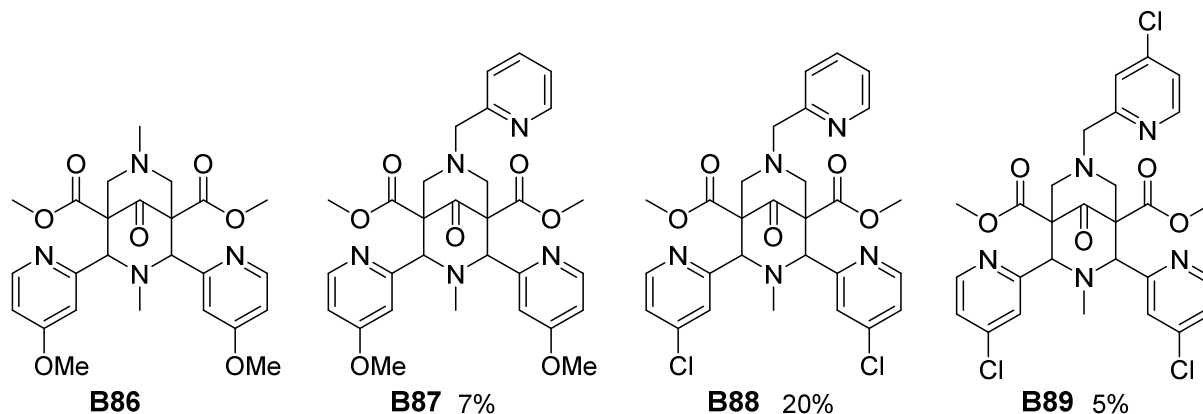


Figure 1. 32: Nouveaux ligands pentadentates comparés au ligand tétradentate MeO-py.

Ces ligands ont été synthétisés via une double réaction de Mannich, dans le tétrahydrofurane et non dans le méthanol, dû à la solubilité des différents précurseurs utilisés. L'insertion de groupements électrodonneurs sur les pyridines augmente significativement la stabilité thermodynamique du complexe de cuivre(II).

ii. Ligands dinucléaires

Plus récemment, en 2010, de nouveaux ligands ont été développés pour la complexation hétéro-bimétallique Cu(II)-Ru(II)⁶¹ (Figure 1. 33).

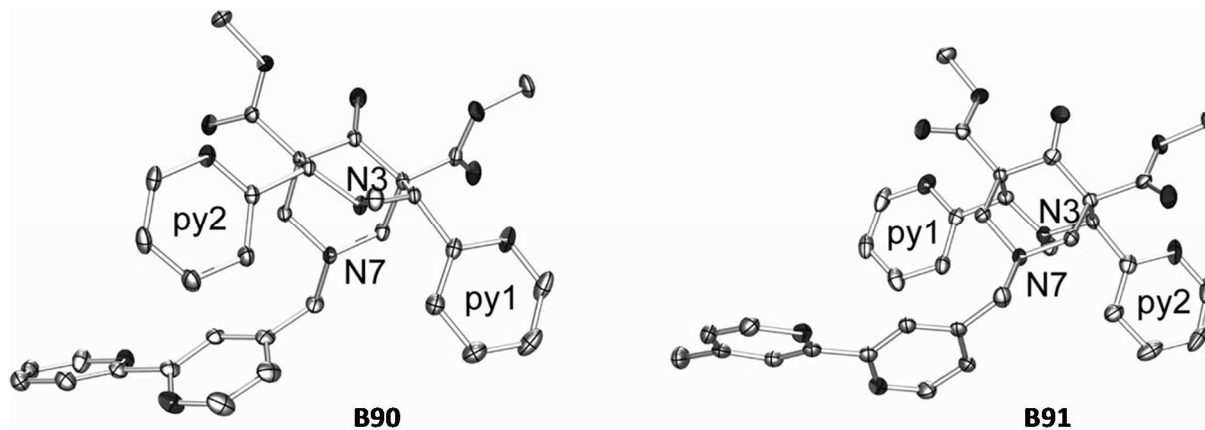


Figure 1. 33: Structures cristallographiques des bispidonones pour la complexation hétéro-bimétallique Cu-Ru.

Dans ce cas particulier, la sous-unité bispidine sert de point d'ancrage pour une sous-unité bipyridine via une liaison covalente. Ces deux ligands adoptent une conformation chaise-chaise et une configuration *cis*, il n'y a donc pas d'influence du groupement incorporé en R₂ pour la coordination du ruthénium (chap. I/ 4. c)).

Enfin, en 2014, une bispidone a été obtenue en vue d'une complexation homo-bimétallique⁶² (Figure 1. 34).

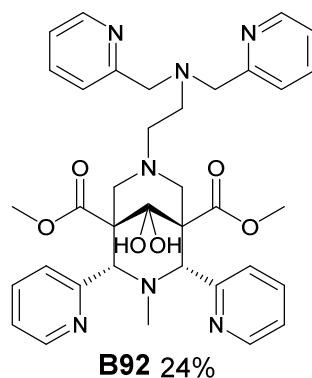


Figure 1. 34: Structure du ligand pour la complexation de deux ions cuivre(II).

Ce type de composé pourra être utilisé comme modèle d'enzymes oxydase du cuivre (chap. I/ 4. d)).

Plus récemment, en 2013, l'équipe de Hasserodt a développé de nouvelles bispidones afin d'obtenir une plateforme permettant de former des complexes de fer(II) à bas spin⁶³ (Figure 1. 35).

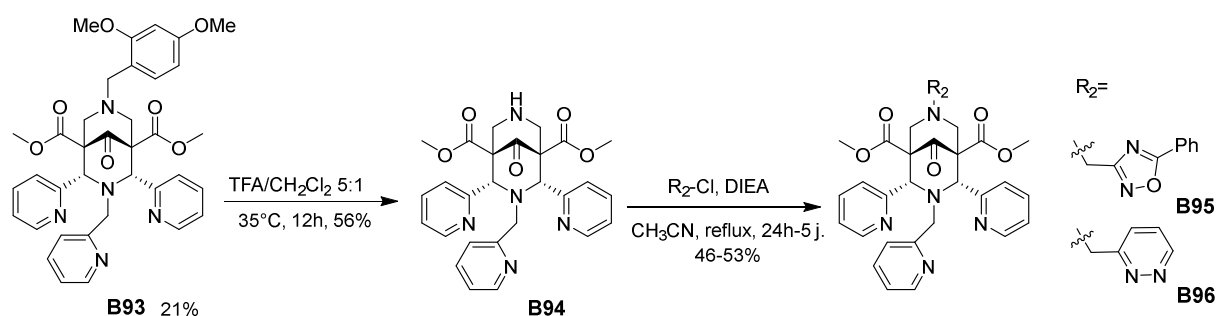


Figure 1. 35: Plateformes bispidones pour la complexation du Fe^{II}.

Ces ligands ont également été obtenus à partir d'un précurseur bispidone commun sur lequel une réaction d'alkylation a été effectuée. Les nouvelles bispidones sont en configuration *cis* et en conformation chaise-chaise, permettant ainsi une bonne complexation du fer(II) (chap. I/ 4. c)).

Le groupe de Whiteoak s'est intéressé au développement de ligands de type bispidones pour la complexation de métaux de transition et leur application comme agents de blanchiment^{64,65} (Figure 1. 36).

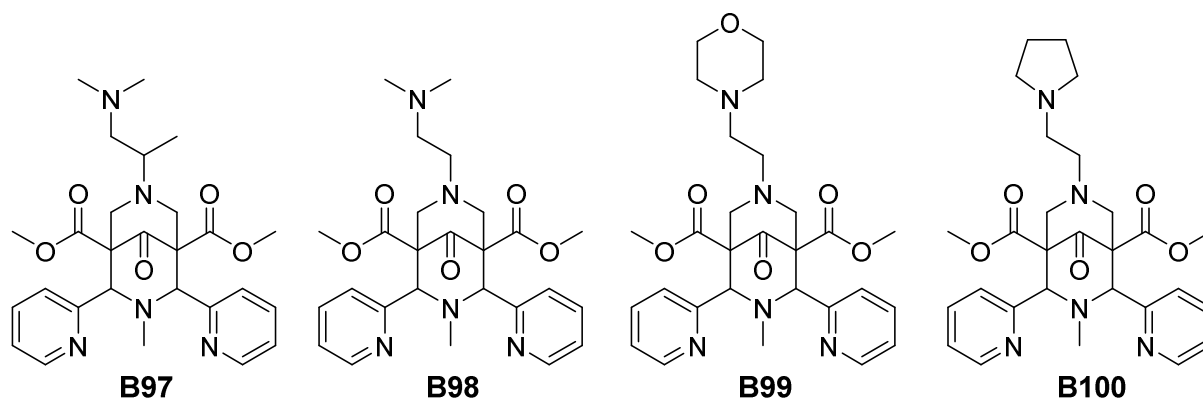


Figure 1. 36: Ligands synthétisés pour la formation de complexes de métaux de transition.

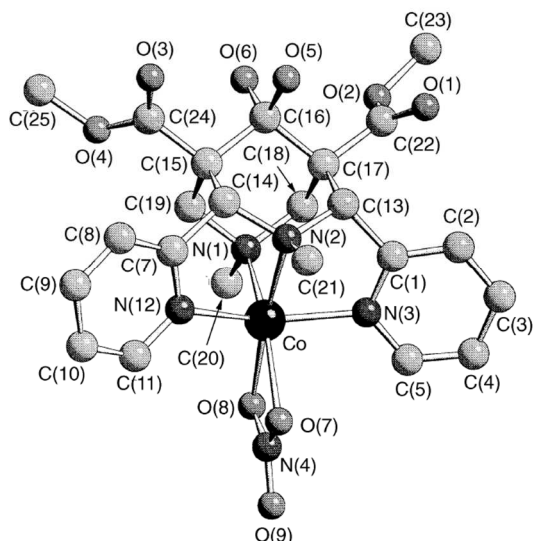
La combinaison d'un complexe comme celui-ci, de peroxyde d'hydrogène ainsi que de pigments colorants, va permettre le blanchiment du tissu lors du lavage de ce dernier. D'autres travaux sur la même thématique ont également fait l'objet de brevets.^{66,67,68,69,70,71}

En conclusion sur l'ensemble de ces ligands, il est possible d'introduire différents substituants sur les azotes N3 ou N7, via des pyridines substituées ou avec d'autres groupements à la place des pyridines. Cependant, il est nécessaire d'obtenir le ligand dans la bonne configuration (chaise-chaise *cis*) afin d'assurer une complexation efficace du métal (chap. I/ 4. c) et d)). Malgré le nombre relativement important de bispidones synthétisées au cours de ces trente dernières années (~ 120), le groupement méthyl est souvent introduit en position R₁ et les variations structurales développées ci-dessus restent limitées. D'autre part, le rendement obtenu sur ces différents ligands est très variable (de 5 à 91%), car les ligands sont toujours obtenus par recristallisation. Dans le cadre du développement de chélatants du ⁶⁴Cu pour la TEP, il est intéressant que la synthèse soit efficace avec un minimum d'étapes.

c) Applications des bispidones à la complexation d'ions métalliques

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la structure des complexes de bispidones avec les métaux de transition. Les complexes de cuivre(II) seront développés ci-après (chap. I/ 4. d)).

En 1997, des complexes de cobalt(II) ont été étudiés par le groupe de Comba⁷² (Figure 1. 37).

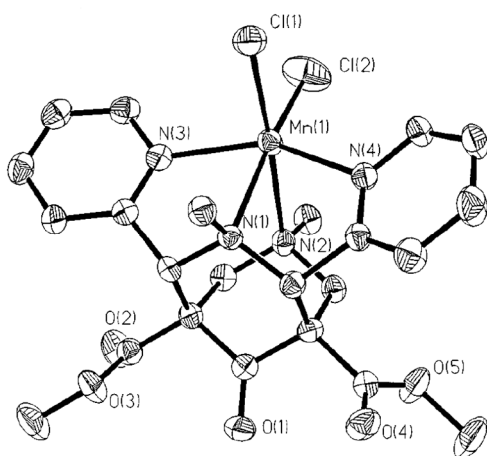


Distances	[CoHZ2NO ₃]
Co(1)-N(1)	2.134(6)
Co(1)-N(2)	2.139(6)
Co(1)-N(3)	2.085(9)
Co(1)-N(12)	2.093(9)
Co(1)-O(7)	2.281(6)
Co(1)-O(8)	2.067(6)

Figure 1. 37: Structure cristallographique du complexe $\text{Co}(\text{HZ2})\text{NO}_3$ (gauche) et distances métal-atomes coordonnants (Å) (droite).

Cette étude a montré l'influence du contre-ion dans la sphère de coordination. En effet, dans le cas de cette structure cristallographique avec le nitrate comme contre-ion, la géométrie adoptée par le métal est une géométrie octaédrique distordue. Dans le cas de la structure calculée en présence de chlorure dans la sphère de complexation, la géométrie préférentielle est une géométrie trigonale-bipyramidale. Cette différence vient du fait que le nitrate est un ligand bidentate alors que le chlorure est monodentate. Or ce dernier, de par sa taille, empêche une sixième coordination de l'ion métallique. Ces études ont montré que le squelette bispidine possédait une sphère de coordination adaptée aux métaux de transition.

Suite aux travaux précédents, des complexes de manganèse(II) ont également été caractérisés⁷³ (Figure 1. 38).



Distances	[MnHZ2Cl ₂]
Mn(1)-N(1)	2.388(4)
Mn(1)-N(2)	2.531(4)
Mn(1)-N(3)	2.231(4)
Mn(1)-N(4)	2.255(4)
Mn(1)-Cl(1)	2.462(2)
Mn(1)-Cl(2)	2.404(2)

Figure 1. 38: Structure cristallographique du complexe $\text{Mn}(\text{HZ2})\text{Cl}_2$ (gauche) et distances métal-atomes coordonnants (Å) (droite).

Dans ce cas là, le manganèse(II) adopte une géométrie *cis*-octaédrique avec les deux pyridines en positions axiales. Du fait de la rigidité du squelette bispidine, le principal mode de distorsion de cette géométrie se fait selon l'angle $N_{py}-Mn-N_{py}$.

En 2002, la même équipe a synthétisé une série de ligands pour la complexation du fer(II).⁵¹ Le but de ces nouveaux ligands est de varier les propriétés électroniques autour du fer via les co-ligands (contre-ion) mais aussi d'augmenter la denticité du ligand en ajoutant des substituants sur la molécule (Figure 1. 39).

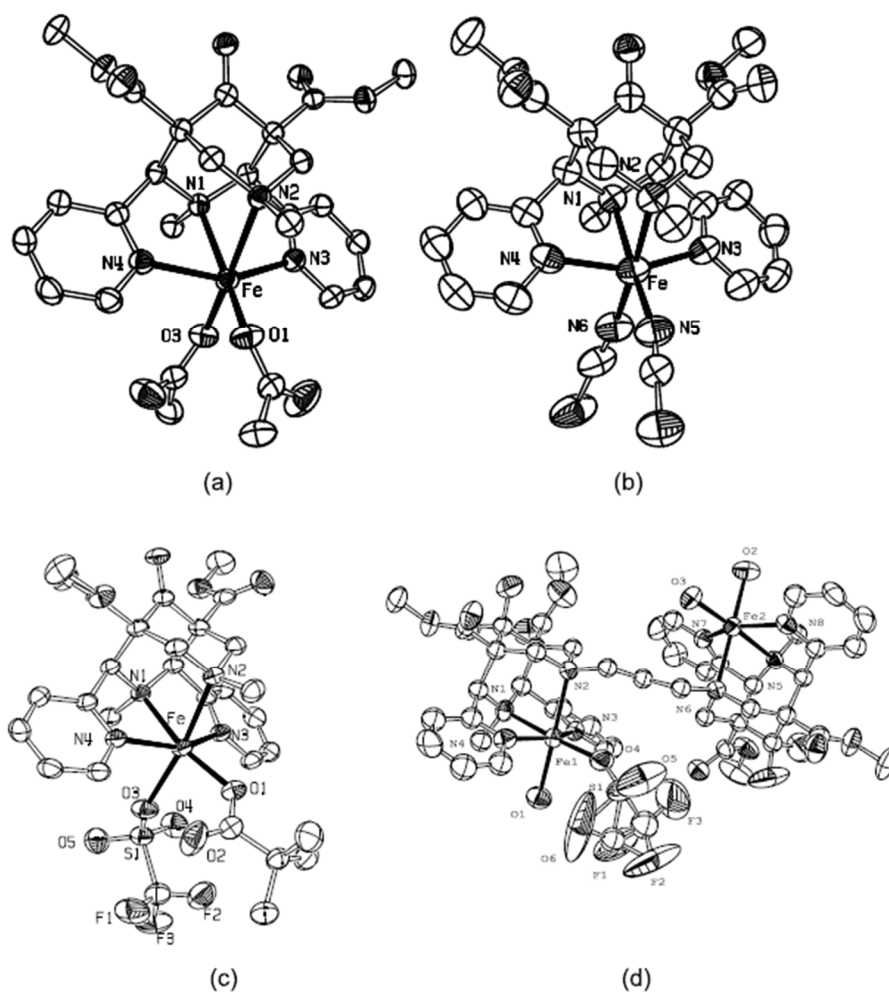


Figure 1. 39: Structures cristallographiques du complexe bipyridine HZ2 avec trois contre-ions différents ((a) $(OAc)_2$, (b) $((NCS)_2)$ et (c) $((piv)(trifl))$), ainsi que le complexe bis-bispidine B41 ((d) $(SO_2CF_3)(H_2O)_3$).

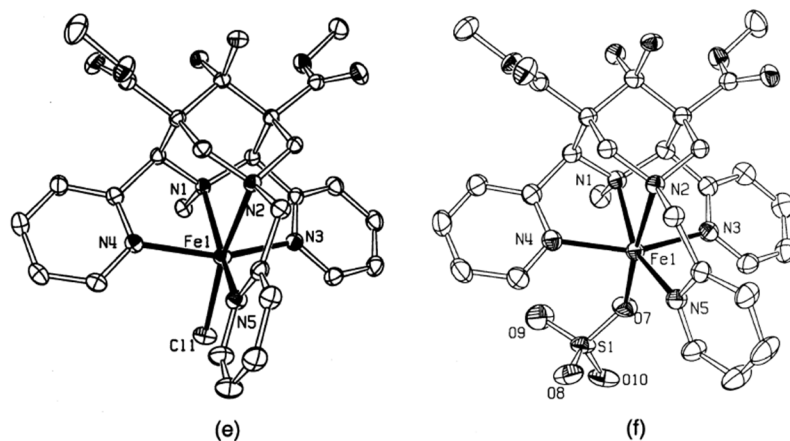


Figure 1. 40: Structures cristallographiques du complexe tris-pyridine B44 ((e) (Cl) et (f) (SO₄)).

Le point important dans cette étude est l'observation de la forte similarité des différents complexes de fer(II) (Figure 1. 41).

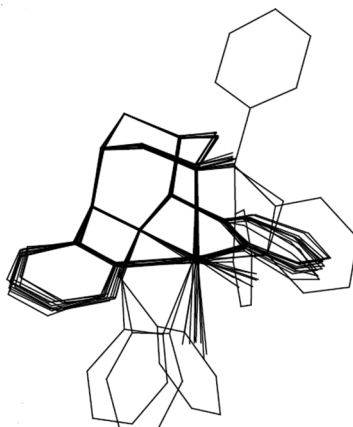


Figure 1. 41: Superposition des structures complexes Fe(II)-bispidines (HZ2, B8, B42, B44, B45, B47, B48 et B84).

En effet, les ligands pentadentates limitent le mouvement de l'ion métallique au centre de la cavité. Pour les ligands tétradentates, à cause de la rigidité du ligand, il est possible d'obtenir deux isomères distincts avec les longueurs $M-N_1 > M-N_2$ ou $M-N_2 > M-N_1$, donc un mouvement du métal selon l'axe N_1-N_2 , qui est fonction des co-ligands. La rigidité du squelette bispidone est une nouvelle fois mise en évidence.

A partir de ce moment, deux applications ont pu être étudiées : la catalyse⁷⁴ et le magnétisme. P. Comba s'est tout d'abord intéressé à l'étude des propriétés catalytiques des complexes de fer(II)/(III), et notamment à la chimie du peroxyde d'hydrogène activé par l'ion métallique ferreux ou ferrique.⁷⁵ Deux complexes ont été caractérisés afin d'étudier la liaison du fer avec H₂O₂ (Figure 1. 42).

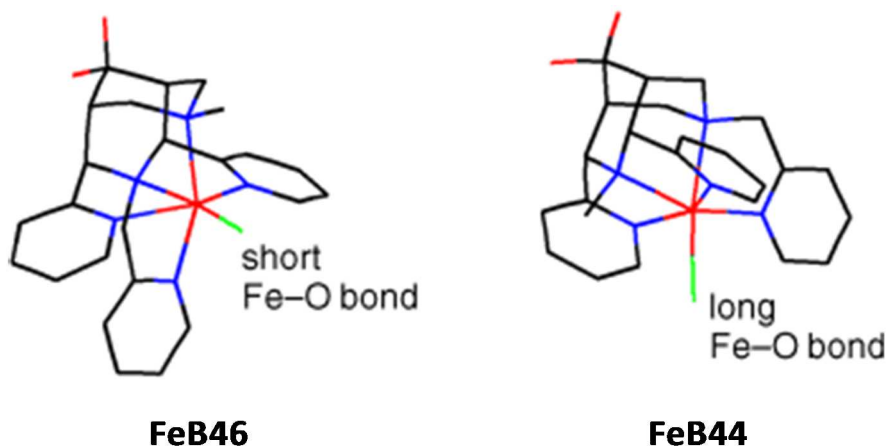


Figure 1. 42: Structures des complexes C et D.

Ces deux ligands sont des isomères de position, l'un possède le groupement méthylpyridine sur le N₃ (**B46**) et l'autre sur le N₇ (**B44**). Le complexe **FeB46** s'est révélé thermodynamiquement plus stable mais le complexe **FeB44** est plus efficace pour la catalyse. En effet, le groupement peroxy présente une interaction plus forte avec le centre ferrique ce qui conduit à une liaison O-O plus faible que dans le cas du complexe **FeB46**.

D'autres études par le groupe Jensen ont porté sur des complexes de fer accélérant l'initiation de la copolymérisation radicalaire par le peroxyde, dans le cadre de la synthèse de résines de type polyesters (Figure 1. 43).^{76,77,78} En effet, un catalyseur à base de métaux de transition est nécessaire pour la décomposition du peroxyde.

Dans cette même thématique de la catalyse, le ligand **HZ2** a été complexé par du fer(III) afin de l'étudier en tant que modèle de la dioxygénase catéchol⁷⁹ (Schéma 1. 5).

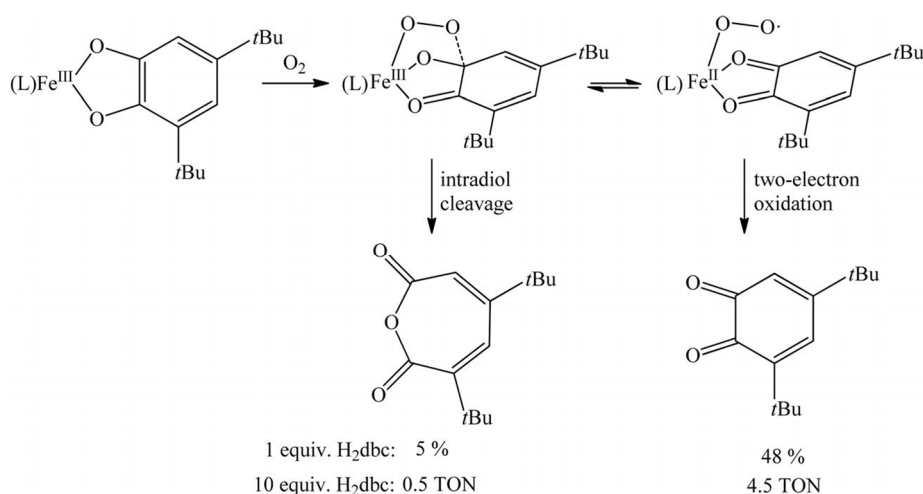


Schéma 1. 5: Mécanisme réactionnel du complexe FeH22 en tant que modèle enzymatique.

Cependant, le produit majoritaire obtenu est la benzoquinone, et non l'anhydride attendu, dû au potentiel redox élevé du catalyseur qui privilégie une activité catécholase. Une autre étude a été menée sur le même sujet avec des complexes dinucléaires (**Cu₂B41**, **Cu₂B42**, **Cu₂B49**) de cuivre(II).⁸⁰

La même année, d'autres complexes de fer(III) (**FeB52**, **FeB53**) ont été étudiés afin d'évaluer leurs capacités en tant que catalyseur pour l'époxydation d'oléfines.⁵³ Les résultats obtenus ont montré que moins la position en R₂ est flexible, plus le potentiel d'oxydo-réduction du catalyseur augmente et par conséquent, plus l'efficacité de celui-ci est importante. Il y a donc un effet de l'encombrement stérique sur les potentiels d'oxydo-réduction.

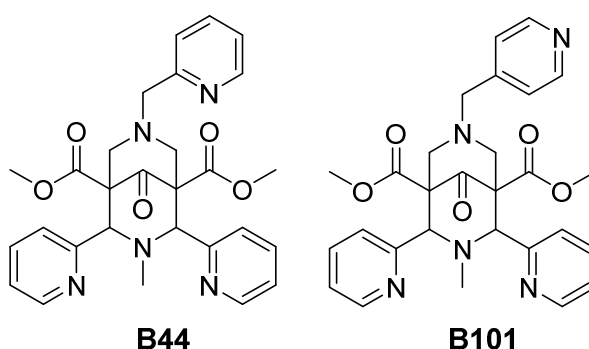


Figure 1. 43: Structures des ligands pour la catalyse du peroxyde.

Des complexes de fer et de manganèse (**MB44** et **MB101**) ont également démontré leur utilité en tant que catalyseurs pour la production de peinture et d'encre.^{81,82}

En 2006, toujours dans la thématique de liaison au peroxyde d'hydrogène, des complexes de cobalt(II) de bispidines tétradentates (**HZ2**, **B4**, **B8**, **B44**, **B47**) ont été préparés et montrent leur oxydation en présence de H₂O₂ pour induire une réaction de N-déalkylation du ligand bispidone en positions R₂⁸³ (Schéma 1. 6).

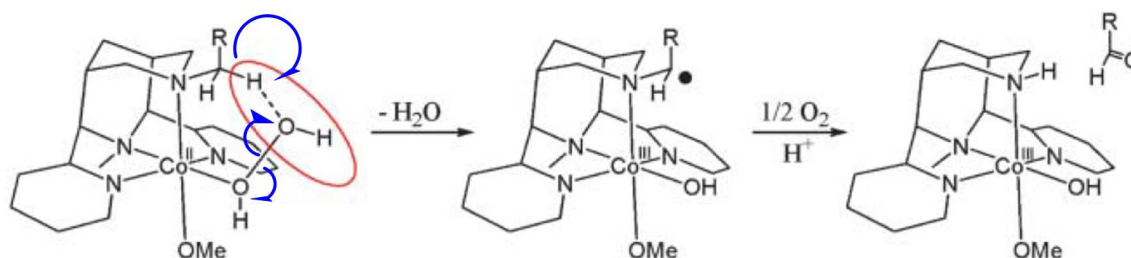


Schéma 1. 6: Mécanisme de N-déalkylation de CoL en présence de peroxyde d'hydrogène.

Il a été montré que sans l'étape de transfert d'électron basée sur le cobalt, le processus de N-déalkylation ne se fait pas.

En 2007, l'équipe de Comba a montré l'intérêt de l'utilisation des bispidines (**HZ2**, **B44** et **B47**) dans le cadre de complexes de vanadium pour la catalyse oxydante⁸⁴ (Figure 1. 44).

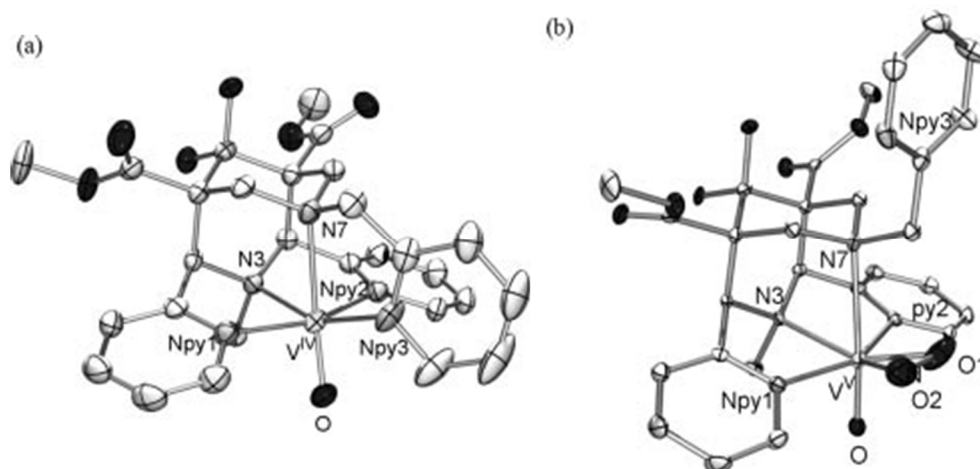


Figure 1. 44: Structures moléculaires des complexes de vanadium oxydo (a) et oxydo-hydroperoxydo (b).

Ces structures ainsi que les études effectuées sur ces complexes ont montré le processus d'oxydation suivant (Schéma 1. 7).

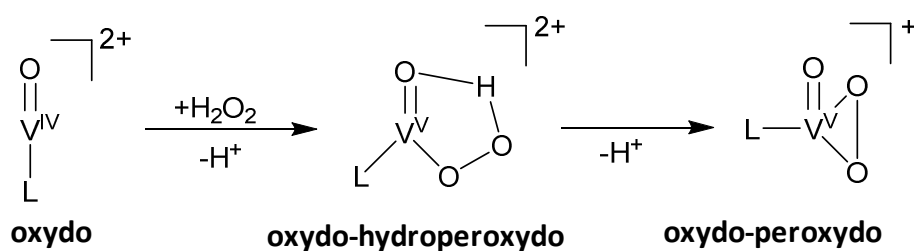


Schéma 1. 7: Processus d'oxydation au sein du complexe de vanadium.

L'oxydation du centre vanadium ainsi que la coordination du groupe peroxydo sont assistés par la structure rigide du ligand bispidine. Cependant les résultats obtenus en tant que catalyseurs ne sont pas concluants, ce qui peut être attribué à une sphère de coordination saturée diminuant fortement la réactivité du complexe oxydé.

Un autre groupe s'est également intéressé à l'utilisation des bispidones comme catalyseurs.⁸⁵ Le catalyseur étudié est un complexe de nickel-bispidine (**NiHZ2**) permettant la formation de liaisons C(sp²)-C(sp³) (Schéma 1. 8).

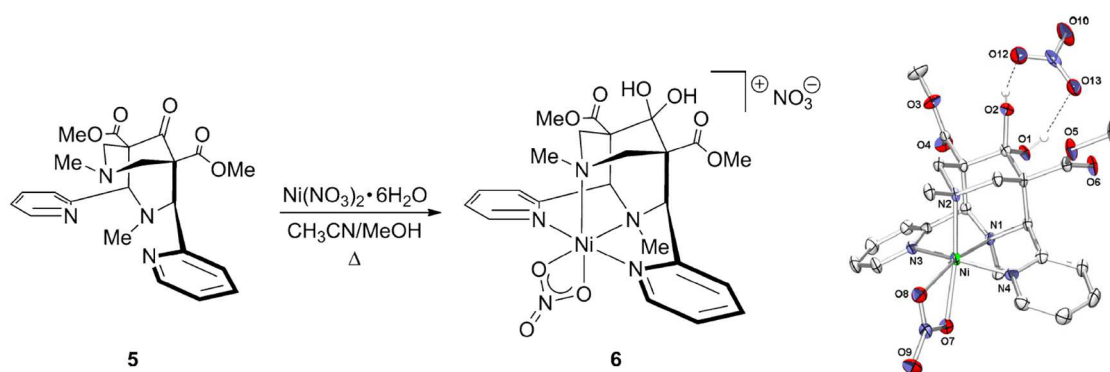


Schéma 1. 8: Formation du complexe Ni-bispidine (gauche) et structure cristallographique de 6 (droite).

Le complexe a montré une bonne efficacité sur de nombreuses formations de liaisons C-C suivant le cycle catalytique décrit ci-après (Schéma 1. 9).

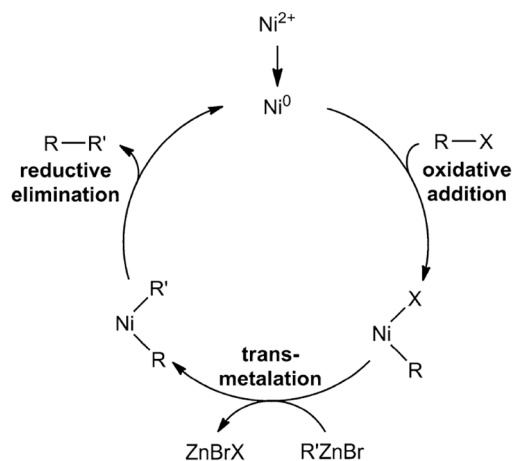
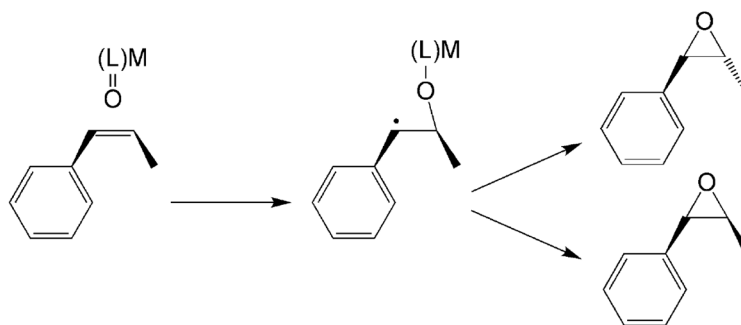
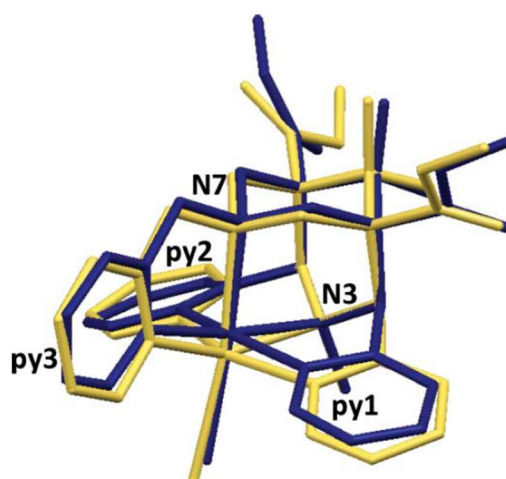


Schéma 1. 9: Cycle catalytique de la réaction de couplage catalysée au nickel.

En 2009, l'équipe de Comba s'est intéressée à l'étude de la stéréosélectivité de l'époxydation catalytique d'oléfine (Schéma 1. 10) par un complexe de fer et un complexe pentadentate de ruthénium (**B44**)⁸⁶ (Figure 1. 45). Le cuivre(II) a également été largement étudié pour son activité catalytique (chap. 1/ 4. d)).

Schéma 1. 10: Schéma d'époxydation du *cis*-β-méthylstyrène.Figure 1. 45: Superposition des cations moléculaires $[(L)Ru(Cl)]^+$ (bleu) et $[(L)Fe(Cl)]^+$ (jaune).

L'obtention de ces structures permet de constater que les liaisons métal-azotes sont plus courtes dans le cas du ruthénium que dans le cas du fer. Le ligand est donc plus adapté à la complexation du Ru^{II} bas-spin que du Fe^{II} haut-spin. Au niveau des résultats catalytiques, le catalyseur à base de ruthénium permet d'obtenir majoritairement du *cis*-époxyde à partir de la *cis*-oléfine. Dans le cas du fer, à partir de la *cis*-oléfine, le produit majoritaire est le *trans*-époxyde. Dans le cas de la *trans*-oléfine, les deux catalyseurs permettent d'obtenir sélectivement du *trans*-époxyde (Schéma 1. 11).

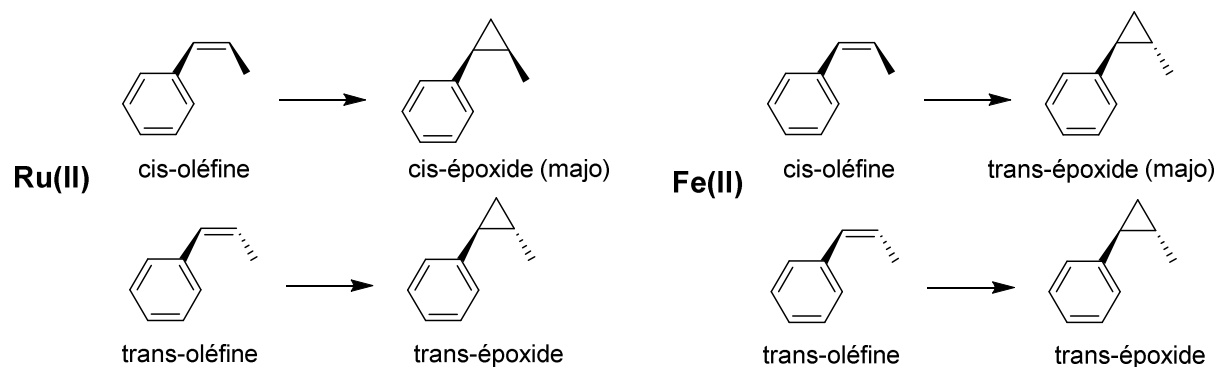


Schéma 1. 11: Produits majoritaires obtenus par les catalyseurs utilisés.

En plus de l'activité catalytique, P. Comba a développé des complexes hétéro-dinucléaires Ru(II)/Cu(II) (**B90**, **B91**)⁶¹ comme sondes luminescentes pour suivre l'évolution de la réaction (Figure 1. 46).

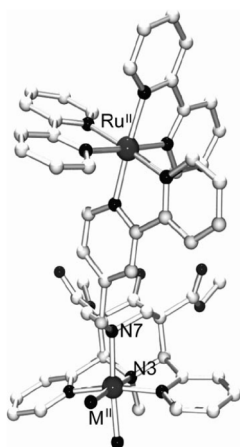


Figure 1. 46: Modèle structural du complexe hétéro-dinucléaire Ru^{II}-M^{II}.

Les résultats ont montré un quenching efficace de la luminescence du ruthénium lorsque le cuivre(II) se coordine à la bispidine et que l'on forme alors le complexe hétéro-dinucléaire Ru^{II}-Cu^{II}. Une fois formé, ce complexe Ru^{II}-Cu^{II} montre une forte activité photocatalytique de la réaction d'aziridination du styrène.

Ces mêmes complexes de fer, ruthénium et cuivre possèdent des propriétés magnétiques intéressantes. L'obtention de complexes de fer haut-spin ou bas-spin présente des applications dans le cadre de plusieurs domaines tels que : les détecteurs,^{87,88} les modèles d'enzyme non hémique pour des études biomimétiques⁸⁹ ou les agents de contraste pour l'IRM.⁹⁰ La problématique réside dans le fait d'obtenir des complexes de fer dont l'état de spin est défini et stable, et non un mélange (haut-spin, bas-spin).⁹¹

Une étude a été menée dans le cadre de cette thématique, sur la complexation d'un ligand bispidine (**HZ2**) par l'alkylperoxyfer(III)⁹² (Figure 1. 47).

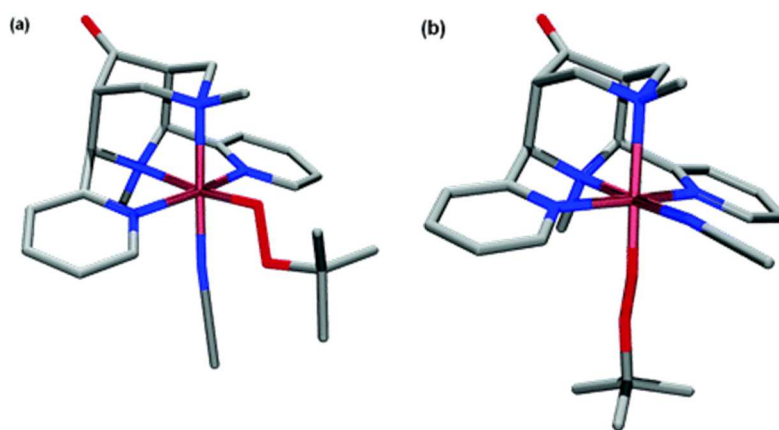


Figure 1. 47: Structures DFT des isomères bas spin du complexe Fe(HZ2)(OO'Bu)(CNMe).

Ce complexe est un système spin-crossover c'est-à-dire que l'état de spin du complexe change selon l'environnement extérieur. La caractérisation de ces complexes a permis d'étudier l'influence du solvant sur la stabilisation spécifique des formes haut ou bas-spin.

Très récemment, le groupe de Hasserodt a utilisé des plateformes bispidines comme chélatants du fer dans l'eau⁶³ (Figure 1. 48).

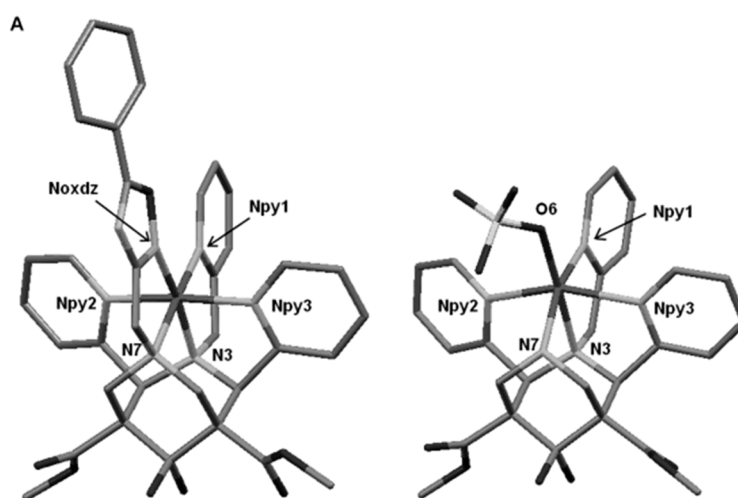


Figure 1. 48: Structures cristallographiques des complexes de fer haut-spin (B96, droite) et bas-spin (B95, gauche).

Ils ont pu développer le premier complexe hexadentate bispidine-Fe(II) bas-spin en introduisant le motif oxadiazole sur le ligand pentadentate. La coordination hexadentate est possible grâce à l'encombrement stérique plus faible induit par la pyridine et l'oxadiazole par rapport à deux pyridines (N3 et N7).

Deux ans plus tard, les propriétés magnétiques de complexes trinucéaires (**B44** et **B55**) ont été étudiées⁹³ (Figure 1. 49).

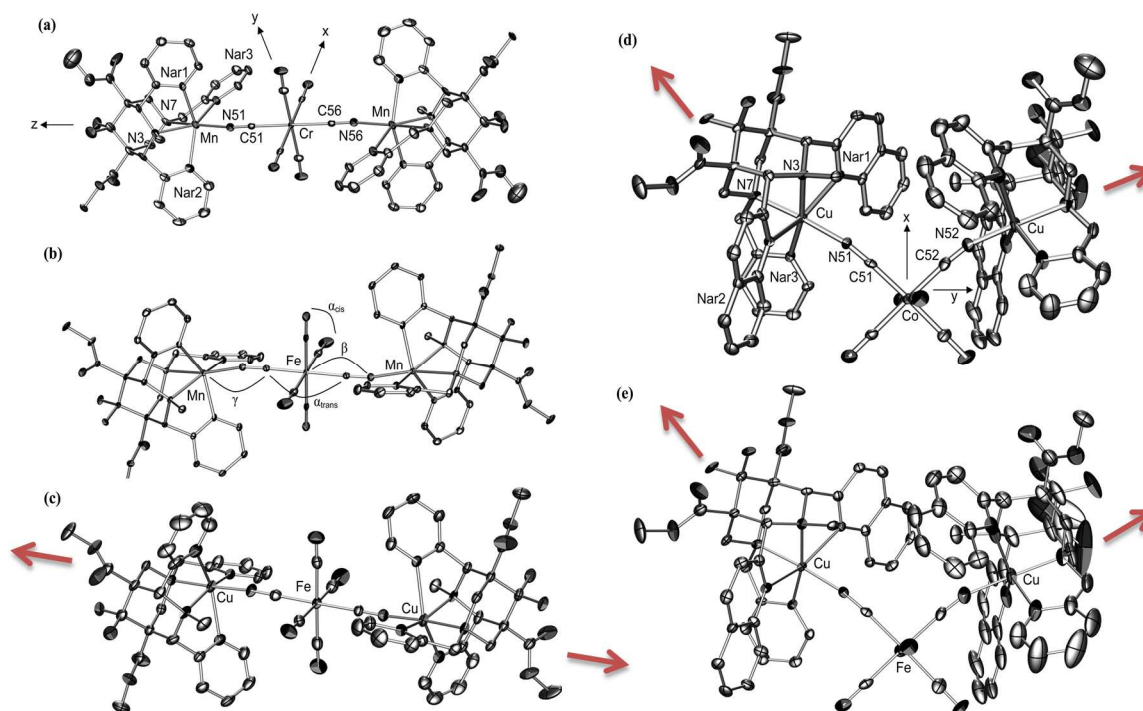


Figure 1. 49: Structures cristallographiques des complexes trinuécléaires ((a) Cr/Mn₂, (b) Fe/Mn₂, (c) Fe/Cu₂, (d) Co/Cu₂, (e) Fe/Cu₂) (flèches : sens de l'élongation).

Chaque complexe trinuécléaire comporte deux ligands bispidonés pentadentates complexés à un métal (Mn ou Cu). Ces métaux sont liés par des ponts cyanures à un troisième métal (Cr, Fe ou Co). Le ligand cyanure va induire un champ de ligand fort et conduire à une déstabilisation de la structure par une élongation selon l'axe CN-Cu-N7 (flèches). De plus, suivant la bispidine utilisée, la configuration obtenue sera soit linéaire soit coudée, pour une configuration *trans* et *cis* respectivement.

Enfin, en 2012, des complexes de nickel(II) des ligands **HZ2**, **B4**, **B44** et **B57** ont été étudiés au niveau de leurs propriétés spectroscopiques et magnétiques⁹⁴ (Figure 1. 50).

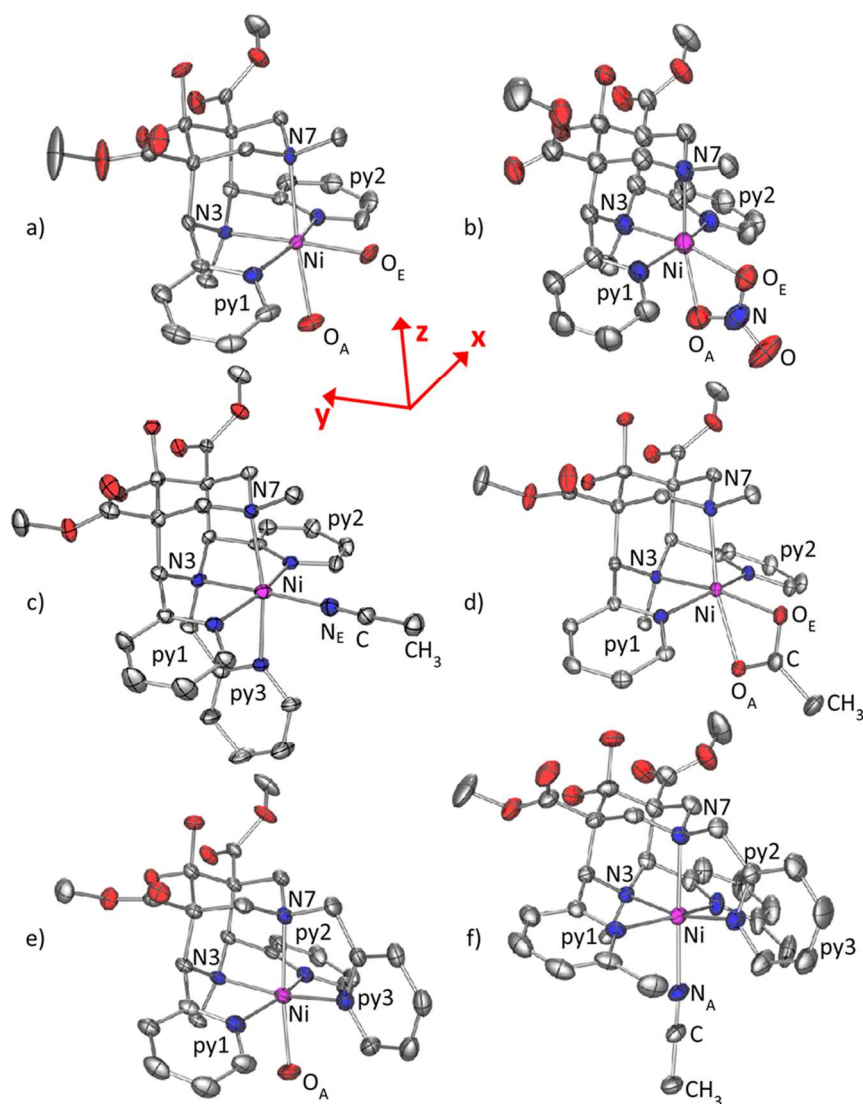


Figure 1. 50: Structures cristallographiques de (a) $[Ni(HZ2.H_2O)(OH_2)_2]^{2+}$, (b) $[Ni(HZ2.H_2O)O_2NO]^+$, (c) $[Ni(B4.H_2O)(NCMe)]^{2+}$, (d) $[Ni(HZ2.H_2O)(OOCH_3)]^+$, (e) $[Ni(B44.H_2O)(OH_2)]^{2+}$ et (f) $[Ni(B57.H_2O)(NCMe)]^{2+}$.

Ces derniers ont montré qu'il leur était possible de conférer un caractère plus σ -donneur au ligand bidentate inclus dans la sphère de coordination montrant un intérêt pour l'activation de petites molécules organiques.

Tous ces exemples nous montrent la grande variété d'utilisation possible des ligands bispidonés. Ils sont à la fois adaptés pour la complexation de nombreux métaux de transitions (Co, Fe, Mn, Ru, Ni, V, Cu) et ils trouvent également des applications dans d'autres domaines tels que la catalyse ou le magnétisme. L'avantage de ces molécules réside dans leur synthèse simple et rapide permettant d'obtenir assez facilement plusieurs dérivés d'un même squelette bispidoné. De plus, la rigidité de ce type de molécule est un atout majeur pour son utilisation dans ces domaines divers.

d) Complexation du cuivre

Cependant, la thématique la plus développée au niveau de ce type de ligands concerne la complexation du cuivre. Cette thématique a été largement développée par Peter Comba au cours des vingt dernières années, notamment en vue de la complexation du cuivre 64 pour des applications en Tomographie par Emission de Positrons.

En 2002, certains des ligands précédemment décrits (**HZ2**, **B41**, **B42**, **B48** et **B84**) ont été caractérisés par rapport à leur complexation à différents métaux de transitions (Cu, Co, Zn, Fe, Mn et Cr).⁹⁵ La superposition de l'ensemble des complexes obtenus montre l'importante rigidité du squelette bispidone (Figure 1. 51).

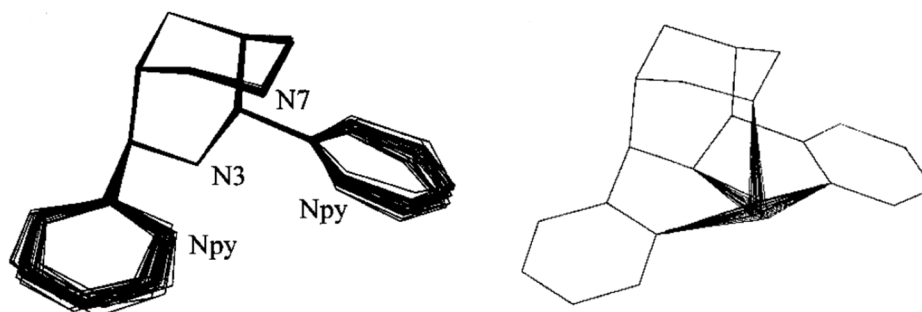


Figure 1. 51: Superposition des squelettes bispidones des complexes caractérisés (gauche), moyenne de la figure de gauche incluant la superposition de l'ensemble des centres métalliques obtenus (Cu, Co, Zn, Fe, Mn et Cr).

L'ensemble des structures montrent une grande similarité entre les différentes espèces obtenues. Il a également été constaté que la structure évolue peu entre le ligand libre et le complexe. D'autre part, les structures obtenues ont pu être classées en deux catégories : $M-N3 = M-N7$ et $M-N3 < M-N7$. Cela dépend de plusieurs critères comme les co-ligands utilisés ainsi que la structure électronique du métal.

Les études suivantes sur les complexes de cuivre(II) par le groupe de Comba ont porté sur la coordination du dioxygène par le métal⁹⁶ (Figure 1. 52).

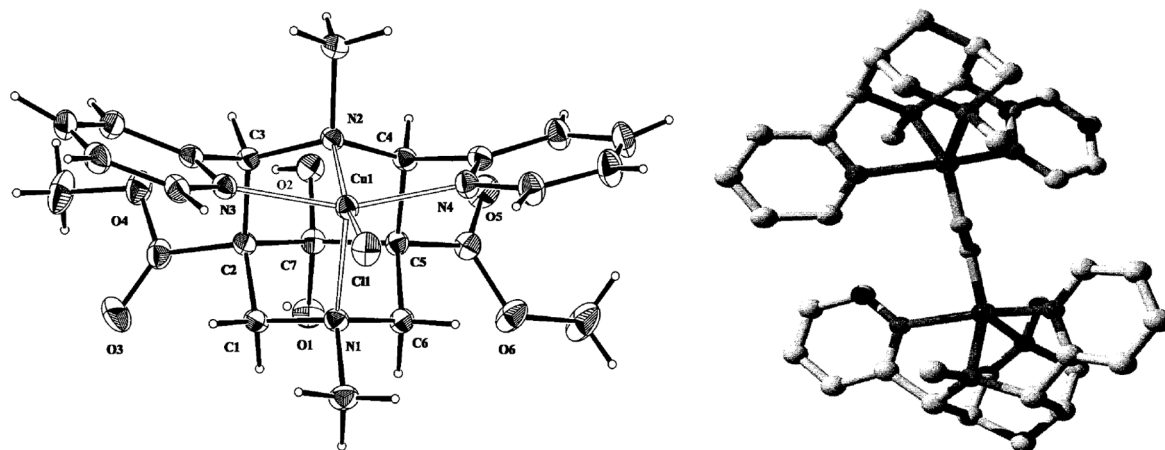


Figure 1. 52: Structure ORTEP du complexe de cuivre [Cu(HZ2)Cl]Cl (gauche) et de la structure théorique/calculée de l'isomère [{Cu(HZ2)}₂O₂]⁺ (droite).

Le complexe de cuivre(II) adopte une géométrie pyramidale à base carrée distordue. L'interaction cuivre(II)-oxygène induit la formation d'un dimère de complexe de cuivre.

Lors de l'étude de nombreux complexes Cu-bispidines, il a été constaté la possibilité de formation de plusieurs « isomères Jahn-Teller »⁵⁴ (Figure 1. 53).

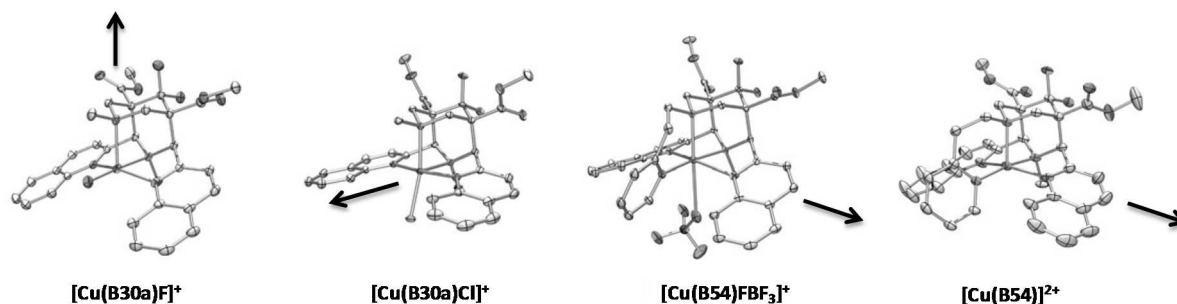


Figure 1. 53: Structures cristallographiques des complexes CuB30a et CuB54 avec différents co-ligands (flèches indiquant la direction de l'élongation).

Ces isomères diffèrent selon l'orientation de « l'axe Jahn-Teller » qui correspond à l'axe selon lequel se fait l'élongation dans la géométrie (bi)pyramide à base carrée. Dans le cas des complexes étudiés ici, trois types d'isomères ont été caractérisés. L'élongation peut se faire suivant les axes Cu-N₃, Cu-N₇ et N(ar1)-Cu-N(ar2). Ces isomères dépendent en partie du co-ligand utilisé lors de la complexation du cuivre(II) et de l'encombrement stérique engendré par le substituant en position N7.

En 2003, des isomères de conformation correspondant à un minimum d'énergie ont pu être isolés et caractérisés (Figure 1. 54).⁵²

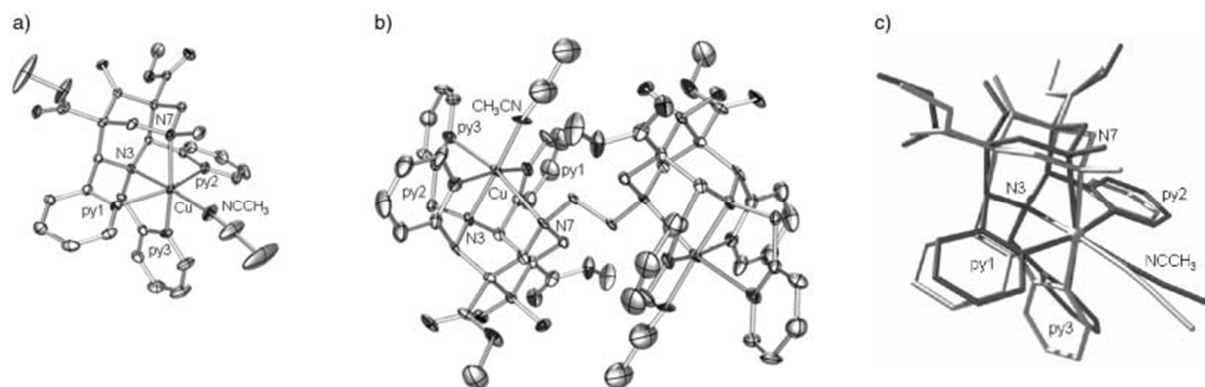


Figure 1. 54: Structure (ORTEP) des complexes a) $[Cu(B46)(NCCH_3)]OTf_2$, (b) $[Cu_2(B51)(NCCH_3)_2]OTf_4$, (c) superposition des structures de (a) et $[Cu_2(B49)(NCCH_3)_2]OTf_4$.

La barrière énergétique entre deux isomères est relativement faible mais ceux-ci ont pu être isolés grâce aux propriétés spécifiques des bispidines qui combinent un squelette rigide pour le ligand avec une sphère de coordination élastique.

La même année, quatre structures cristallographiques du ligand bis-2-méthylpyridine (**B84**) ont été caractérisées⁹⁷ (Figure 1. 55).

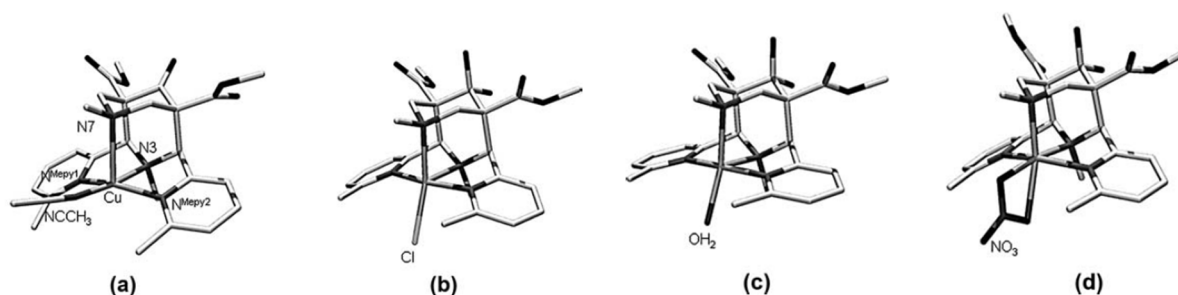


Figure 1. 55: Structures cristallographiques des complexes obtenus à partir de différents co-ligands.

Ces structures montrent bien l'obtention de trois isomères « Jahn-Teller ». Dans le cas du complexe (a), la géométrie obtenue est pyramidale à base carrée avec le co-ligand $NCCH_3$ en *trans* à ce N3. Pour (b) et (c), la géométrie est identique mais les contre-ions Cl^- et OH_2 sont en *trans* par rapport à N7. Tandis que pour (d), la géométrie est octaédrique, due à la présence du co-ligand bidentate NO_3^- qui provoque l'élongation des liaisons $Cu-N_{pyridines}$.

Cette étude sur les complexes de cuivre(II) a été poursuivie avec la synthèse de nouveaux ligands (**HZ2**, **B40**, **B41**, **B42**, **B43** et **B84**) permettant d'étudier leurs structures, leurs propriétés en solution ainsi que leur réactivité à l'oxygène⁵⁰ (Figure 1. 20). Tous les complexes obtenus adoptent une géométrie pyramidale à base carrée avec l'azote N7 en position apicale (Figure 1. 56).

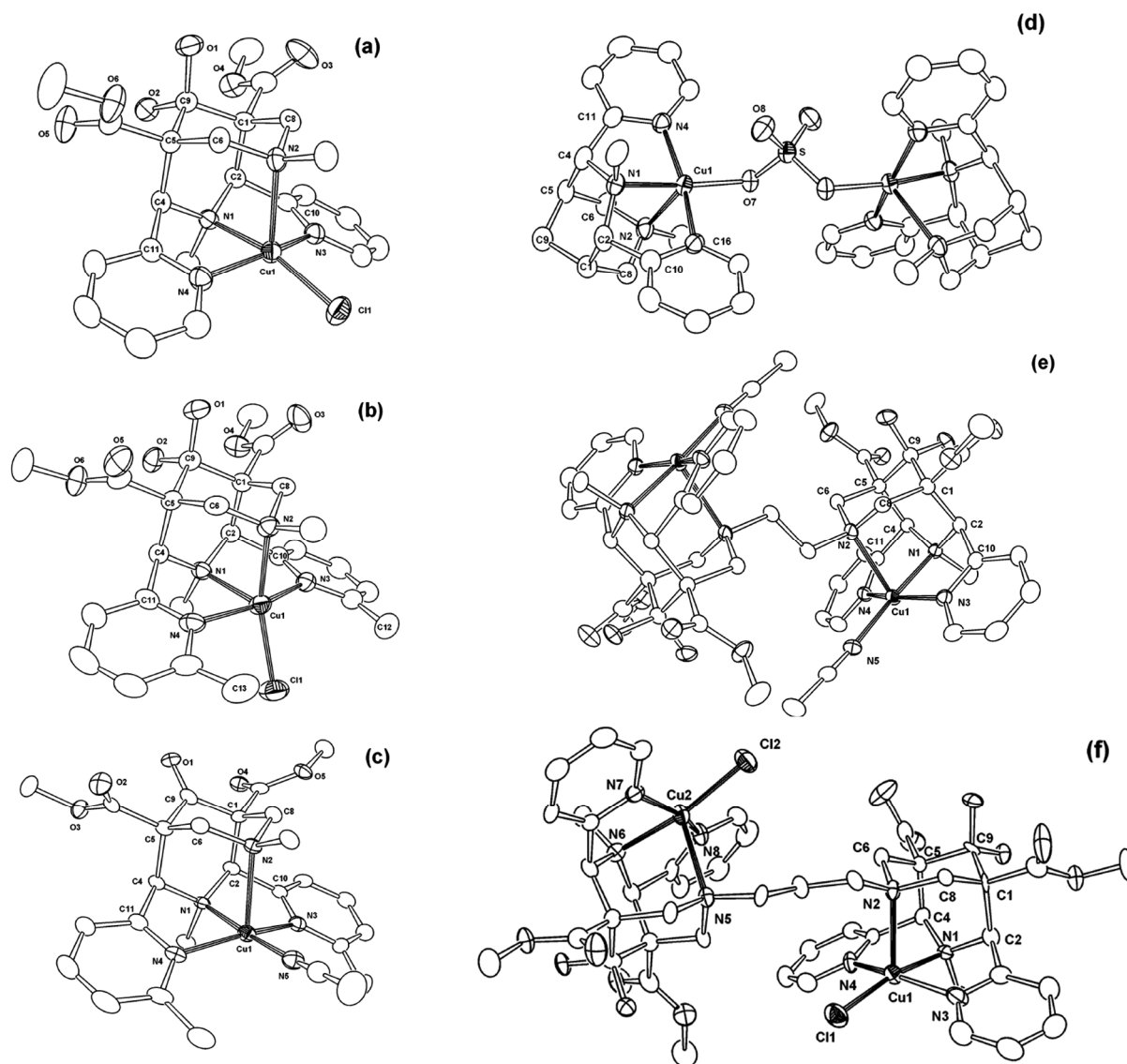


Figure 1. 56: Structures RX de complexes de cuivre avec différents contre-ions.

Le substrat (O_2) se retrouve donc dans le plan carré ce qui induit une forte interaction, avec le dioxygène par exemple. En effet, la stabilité des espèces peroxy-cuivre est très intéressante dans le cas des bispidines, notamment dans le cas d'espèces dinucléaires (d-f). Cette stabilité est plus forte lorsque les deux sous-unités mononucléaires sont liées par un pont alcane (éthyl par exemple).

En 2003, des études sur des complexes de cuivre ont été menées avant d'évaluer leur efficacité pour l'aziridination catalytique.⁹⁸ Il a été remarqué que la coordination au cuivre, en conditions non-anhydres, induisait la présence d'une fonction hydrate (diol géminale) à la place de la cétone centrale (Figure 1. 57).

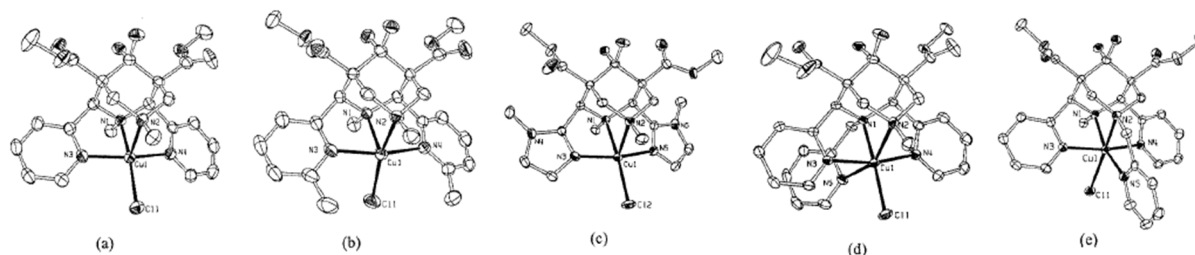


Figure 1. 57: Structures ORTEP des complexes de cuivre(II) ((a)HZ2, (b)B84, (c)B63, (d)B8 et (e)B44).

D'autre part, la rigidité du ligand contraste avec une certaine élasticité de la sphère de coordination. Enfin, il a été observé que la liaison Cu-Cl était très courte et forte (2,2 Å). Ces complexes présentent des caractéristiques similaires, excepté le ligand **B84** qui possède un potentiel d'oxydo-réduction beaucoup plus faible que les quatre autres ligands.

Lors des tests catalytiques, c'est pourtant ce dernier qui a présenté la meilleure efficacité. En effet, la déstabilisation de la forme oxydée du complexe **CuB84** peut être à l'origine d'une force conductrice permettant une activité importante du catalyseur. Les facteurs stériques jouent également un rôle dans la différence de réactivité. En conclusion, de faibles changements structuraux peuvent largement influencer la réactivité du complexe en vue d'activité catalytique.

En 2008, des essais de catalyse d'aziridination ont été réalisés sur d'autres complexes de cuivre(II) (**B26b**, **B60**, **B61**, **B62**, **B64**, **B68**, **B69**, **B70** et **B77**)⁹⁹ et ont montré une corrélation entre le potentiel oxydo-réducteur du catalyseur et l'efficacité catalytique (plus le potentiel est élevé, plus l'efficacité est bonne).

En 2005 puis en 2007, des études physico-chimiques ont été effectuées sur certains ligands afin de déterminer leurs constantes de protonation et de complexation^{55,100} (Figure 1. 58, Tableau 1. 5).

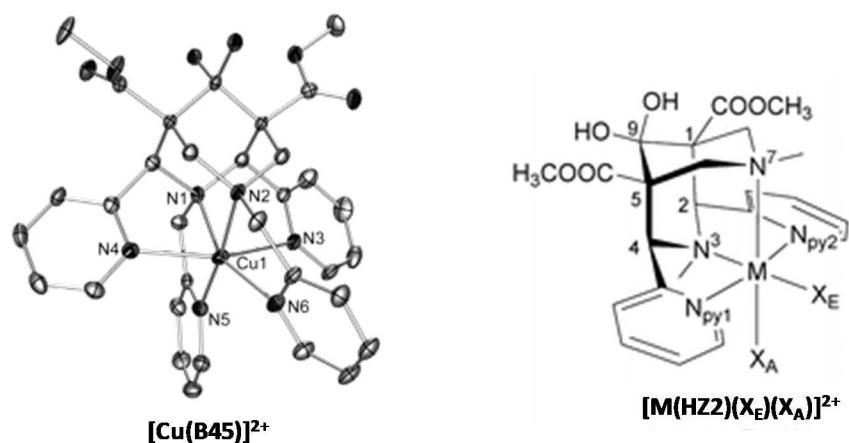


Figure 1. 58: Structure cristallographique du complexe CuB45 (gauche) et formule du complexe MHZ2 (droite).

Métaux ---	log K_{ML}						$E^\circ (\text{Cu}^{II}/\text{Cu}^I)$
	Ligands	Cu(I)	Cu(II)	Co(II)	Ni(II)	Zn(II)	
B45		16,28	7,03	5,02	9,18	3,7	-659 ^a
HZ2	9,5	16,56	5,46		11,37	2,7	-425 ^b
B84	8,9	9,6		7,5		3,9	-45 ^b
B44	9,6	18,31	6,23	6,1	8,28		-523 ^b
B8	8,8	15,66	13,69	9,54	13,57	3,65	-413 ^b

^aDans CH₃CN, vs Fc/Fc⁺; $\mu = 0,1$. ^bDans H₂O, vs Ag/AgCl; $\mu = 0,1$.

Tableau 1. 5: Constantes de complexation associées et potentiel redox.

Les constantes de complexation du ligand **B45** montrent une forte sélectivité pour le cuivre(II) par rapport aux métaux de transition voisins (Zn, Ni et Co) et au lithium(I). Malgré la rigidité du squelette bispidone, la sphère de coordination est élastique et ne prédisait donc pas une telle sélectivité vis-à-vis de la taille de l'ion métallique. Pourtant l'obtention d'une constante de complexation élevée a démontré la forte complémentarité du système Cu²⁺/**B45**. La rigidité du ligand est donc un facteur important au niveau de la sélectivité du métal.

Pour les quatre autres ligands, une sélectivité pour le cuivre(II) est observée même si les valeurs des constantes de stabilité sont très variables. En effet, le ligand pentadentate **B44** présente la plus grande constante ainsi que la plus grande sélectivité tandis que son isomère, le ligand **B8**, possède une constante et une sélectivité plus faible, du même ordre de grandeur que le ligand **B84**. L'ensemble de ces résultats traduisent l'importance de la structure et des propriétés moléculaires des complexes, notamment au niveau de l'introduction d'une fonction coordinante sur l'azote N3.

Plus récemment, en 2013, l'équipe de Comba s'est intéressée à la basicité des groupements donneurs aromatiques et leur influence sur les propriétés des complexes formés (**B75** à **B85**).⁵⁹ Une corrélation linéaire a été mise en évidence entre le potentiel d'oxydo-réduction et la stabilité thermodynamique des ligands bispidines tétradentates. Il a également été montré une autre corrélation linéaire entre les potentiels d'oxydo-réduction et les valeurs des pKa des groupements pyridines substitués. Onze nouveaux ligands ont été synthétisés dans ces travaux avec différents substituants au niveau des pyridines. Les pKa déterminés s'étalent sur une large gamme (de 0,81 à 6,55). Il en est de même pour les potentiels d'oxydo-réduction (de -30 mV à -563 mV). Il est également constaté la quasi-réversibilité de ces systèmes, ce qui est un paramètre essentiel pour l'obtention d'un bon chélatant bifonctionnel.

En 2009, une série de ligand (**HZ2**, **B84**, **B44**, **B48**) a permis de montrer des nombres de coordination et des géométries variés pour des complexes de cuivre(I)¹⁰¹ (Figure 1. 59).

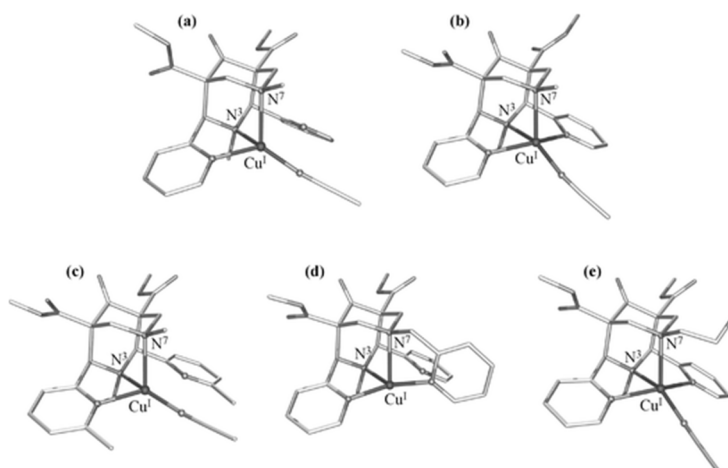


Figure 1. 59: Structures cristallographique des complexes de cuivre(I).

Le ligand **HZ2** ((a) et (b)) peut cristalliser sous deux formes : tétra-coordinée ou penta-coordinée. Il est important de noter que dans le cas du cuivre(I) tétradentate,¹⁰² c'est une des pyridines qui n'est pas coordonnée au métal. Le cuivre(I) est donc moins encapsulé par la cavité rigide de la bispidine. Des études RMN à température variable ont montré un échange rapide entre les deux formes, la barrière énergétique est donc faible entre les deux géométries. Cependant dans le cas du ligand **B84** (c), la forme tétra-coordinée est la plus stable. Ce résultat peut s'expliquer par la présence de substituants plus encombrants (2-méthylpyridine).

Des complexes de cuivre(II) (**HZ2** et **B44**) ont ensuite été utilisés comme complexes hétéro-bimétalliques Cu(II)/Fe(II) via un pont cyanure¹⁰³ (Figure 1. 60).

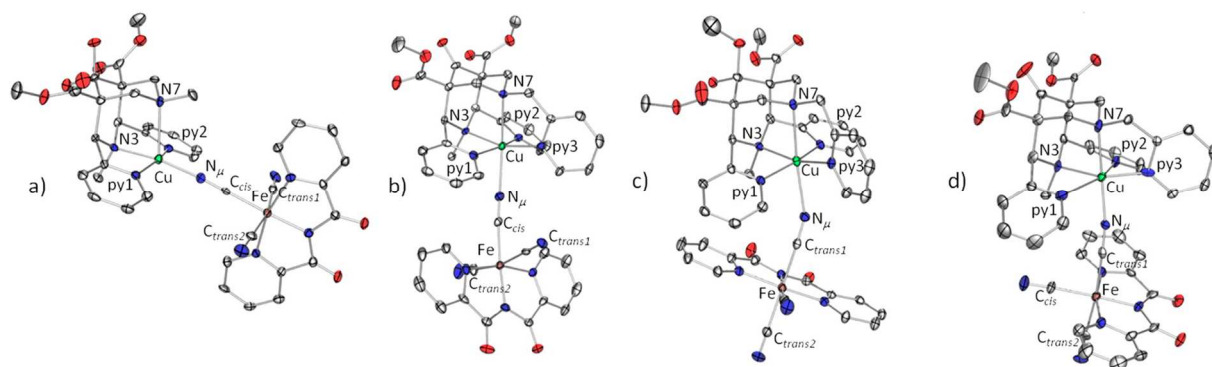


Figure 1. 60: Structures cristallographiques des complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Cu}^{\text{II}}$ pontés par un groupement cyanure.

Différents isomères ont pu être isolés suivant les co-ligands utilisés. Les propriétés de ces différentes espèces ont été étudiées et c'est l'espèce (a) qui présente la distance $\text{Cu}^{\text{II}}\dots\text{Fe}^{\text{III}}$ la plus courte (5 Å). Les trois autres structures présentent des énergies très similaires. Il est donc peu probable d'arriver à une isolation sélective de l'un des isomères.

En 2014, un ligand heptadentate N-donneur (**B92**) a été synthétisé, caractérisé et complexé⁶² (Figure 1. 61).

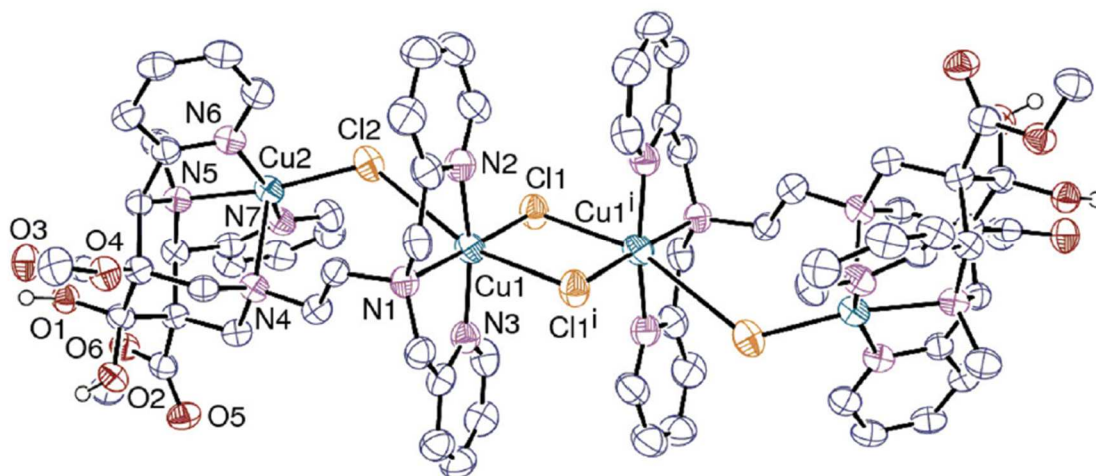


Figure 1. 61: Structure du complexe dinucléaire ponté par des ions chlorures.

Le ligand peut donc complexer fortement deux entités cuivre(II). Cu1 se trouve dans une géométrie octaédrique avec une liaison $\text{Cu1}\dots\text{Cl2}$ longue (3,21 Å). Cette distance indique que le système subit une distorsion de type Jahn-Teller majeure. L'autre ion métallique Cu2 possède une géométrie pyramidale à base carrée. L'intérêt de ce type de molécule est la formation possible d'agrégats magnétiques grâce à des couplages ferro- et antiferromagnétique.

En 2011, des études structurales d'un nouveau complexe de cuivre(II) ont été effectuées dans le cadre de l'utilisation de petits hétérocycles comme composants de ligands multidentates¹⁰⁴(Figure 1. 62).

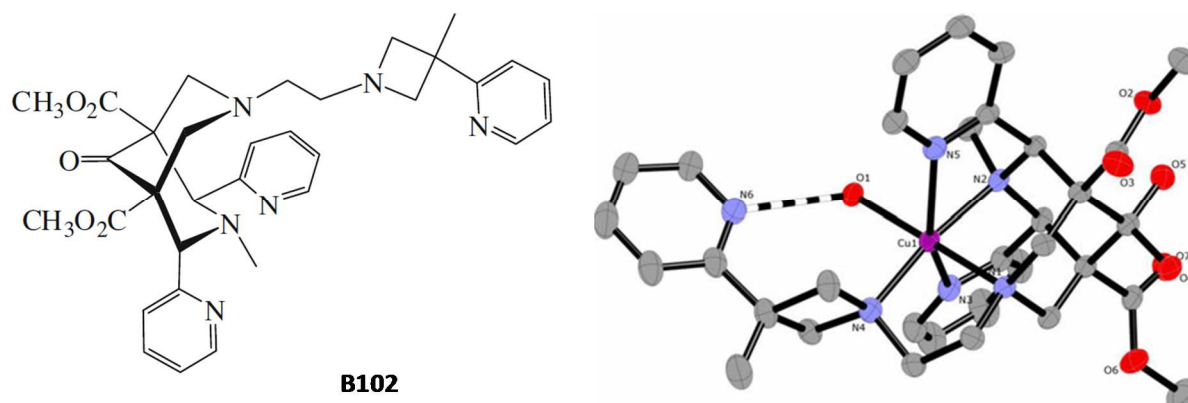


Figure 1. 62: Formule du ligand B98 et structure cristallographique du complexe CuB98.

L'insertion d'une nouvelle chaîne en position R₂, permet l'incorporation de deux atomes coordinants dont l'un va coordiner le métal et l'autre va faire une liaison hydrogène avec le co-ligand (6^{ème} coordiant du cuivre(II)).

Un an plus tard, des ligands ont été mis au point à partir de pyridines substituées (**B86** à **B89**) afin de déterminer leur potentiel en tant que chélatant bifonctionnel pour la TEP⁶⁰(Figure 1. 63).

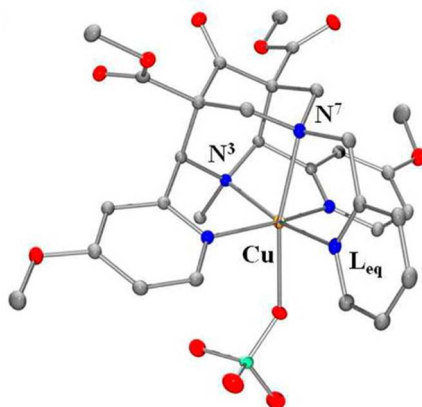


Figure 1. 63: Structure cristallographique du complexe $[Cu^{II}(B82)(OCIO_3)](ClO_4)$.

Les potentiels d'oxydo-réduction ont été calculés et les constantes de stabilité ont été déterminées à partir de la corrélation décrite ci-dessus.⁵⁹ Les données semblent indiquer que les ligands pentadentates donnent des complexes plus stables que les ligands tétradentates. Des essais de radiomarquage ont été effectués et deux bispidonés n'ont montré quasiment aucune transchélation en présence de cyclam au bout de 24h (Radio-TLC). D'autre part, la réduction de la cétone centrale en alcool augmente l'hydrophilicité des composés et donc leur élimination par voie rénale.

Pour conclure sur cette partie portant sur la complexation du cuivre par les bispidines et les intérêts possibles, nous allons nous intéresser à l'utilisation d'un ligand bispidine comme chélatant bifonctionnel.

En 2009, le groupe de Comba utilise la bispidine tétrapyridine (**B45**) comme squelette de base pour des applications en TEP.¹⁰⁵ Cette entité bispidine a été réduite en alcool au niveau de la cétone centrale pour plus de stabilité (chap. II) puis hydrolysée au niveau de ses esters méthyliques (Schéma 1. 12).

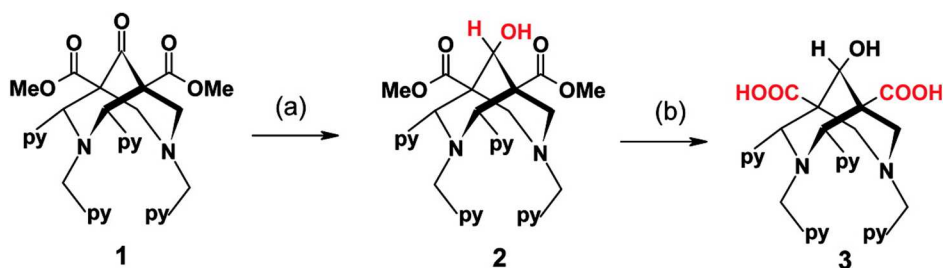


Schéma 1. 12: Schéma réactionnel de l'obtention du bispidol hydrolysé ((a) (i) NaBH_4 , dioxane/eau (1/1), t.a., 24h, (ii) H_2O , HCl , 55%; (b) CsOH , THF , 24h, 66%).

Les acides carboxyliques obtenus sont ensuite couplés avec l'éthyl-4-aminobutyrate pour former des liaisons amides. Puis les esters éthyliques de l'espaceur ont été hydrolysés. Ces deux étapes ont permis d'introduire un espaceur ainsi que deux fonctions réactives et donc d'avoir un chélatant bifonctionnel. L'espèce obtenue a ensuite réagi avec la bombésine afin d'obtenir le composé marqué final qui a été marqué au ^{64}Cu (Figure 1. 64).

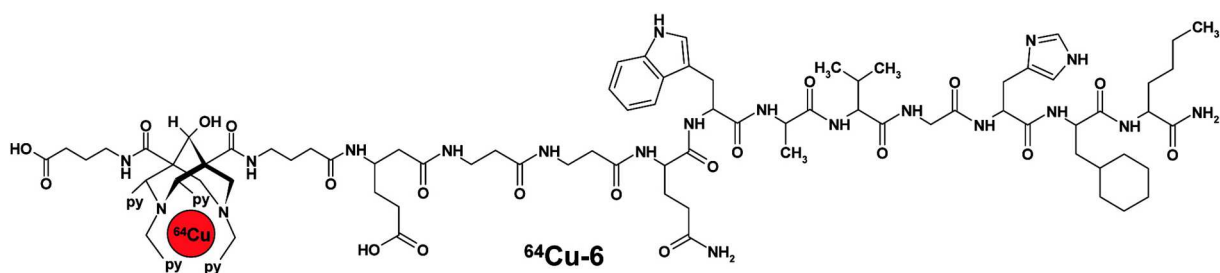


Figure 1. 64: Formule du conjugué Bombésine-bispidine marqué au cuivre 64.

Des essais *in vitro* en présence de SOD n'ont montré aucune transchélation ou démétallation. Des expériences de biodistribution ont ensuite été effectuées et n'indiquent pas de démétallation. Des études TEP ont montré une accumulation de ce conjugué dans les tissus exprimant la GRPr (gastrin-releasing peptide receptors).

5. Conclusion

Au travers des différents travaux sur les molécules de type bispidines décrits dans la littérature et au vu des avancées effectuées dans le domaine de la TEP, et notamment de l'émergence du

⁶⁴Cu comme émetteur de positron, le laboratoire a décidé de développer de nouveaux chélatants bifonctionnels du cuivre 64.

En effet, cette première partie a permis de constater que les ligands bispidines représentent une plateforme intéressante pour le développement de nouveaux radiopharmaceutiques car il est possible de concilier une forte complexation du métal dans la cavité du ligand mais également d'introduire des fonctions réactives permettant le couplage. Des complexes de cuivre(II) stables ont d'ailleurs pu être isolés et caractérisés, ce qui est prometteur pour la complexation du cuivre 64. C'est pourquoi l'association de ce type de ligand avec cet émetteur de positrons semblait être intéressante à étudier et à développer dans notre laboratoire.

Dans une deuxième partie, sera développée la synthèse des ligands pour la complexation du cuivre(II) et leurs caractérisations. Les propriétés structurales et physico-chimiques de ces ligands seront ensuite étudiées. Puis, dans une quatrième partie, nous développerons les différentes voies de fonctionnalisation utilisées pour l'obtention de chélatants bifonctionnels. Et enfin, nous terminerons par une dernière partie détaillant l'agrandissement de la famille des bispidines en vue de la complexation d'autres éléments du tableau périodique.

-
- ¹ Ramogida, C. F.; Orvig, C. Tumour Targeting with Radiometals for Diagnosis and Therapy. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4720–4739.
- ² Hawkins, R. A.; Hoh, C.; Glaspy, J.; Choi, Y.; Dahlbom, M.; Rege, S.; Messa, C.; Nietszche, E.; Hoffman, E.; Seeger, L.; et al. The Role of Positron Emission Tomography in Oncology and Other Whole-Body Applications. *Semin. Nucl. Med.* **1992**, *22*, 268–284.
- ³ Coenen, H. H.; Elsinga, P. H.; Iwata, R.; Kilbourn, M. R.; Pillai, M. R. A.; Rajan, M. G. R.; Wagner Jr., H. N.; Zaknun, J. J. Fluorine-18 Radiopharmaceuticals beyond [¹⁸F]FDG for Use in Oncology and Neurosciences. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 727–740.
- ⁴ Stöcklin, G. L. Is There a Future for Clinical Fluorine-18 Radiopharmaceuticals (excluding FDG)? *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 1612–1616.
- ⁵ Hoh, C. K. Clinical Use of FDG PET. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 737–742.
- ⁶ Williams, J. E. Donner Laboratory: The Birthplace of Nuclear Medicine. *J Nucl Med* **1999**, *40*, 16N–20N.
- ⁷ Kim, J. Y.; Park, H.; Lee, J. C.; Kim, K. M.; Lee, K. C.; Ha, H. J.; Choi, T. H.; An, G. I.; Cheon, G. J. A Simple Cu-64 Production and Its Application of Cu-64 ATSM. *Appl. Radiat. Isotopes* **2009**, *67*, 1190–1194.
- ⁸ Le, V. S.; Howse, J.; Zaw, M.; Pellegrini, P.; Katsifis, A.; Greguric, I.; Weiner, R. Alternative Method for ⁶⁴Cu Radioisotope Production. *Appl. Radiat. Isotopes* **2009**, *67*, 1324–1331.
- ⁹ McCarthy, D. W.; Shefer, R. E.; Klinkowstein, R. E.; Bass, L. A.; Margeneau, W. H.; Cutler, C. S.; Anderson, C. J.; Welch, M. J. Efficient Production of High Specific Activity ⁶⁴Cu Using a Biomedical Cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 35–43.
- ¹⁰ Szajek, L. P.; Meyer, W.; Plascjak, P.; Eckelman, W. C. Semi-Remote Production of [⁶⁴Cu]CuCl₂ and Preparation of High Specific Activity [⁶⁴Cu]Cu-ATSM for PET Studies. *Radiochim. Acta* **2009**, *93*, 239–244.
- ¹¹ Linder, M. C.; Goode, C. A. *Biochemistry of Copper*; Plenum Press, **1991**.
- ¹² Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
- ¹³ Zeglis, B. M.; Houghton, J. L.; Evans, M. J.; Viola-Villegas, N.; Lewis, J. S. Underscoring the Influence of Inorganic Chemistry on Nuclear Imaging with Radiometals. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1880–1899.
- ¹⁴ Hathaway, B. J. Copper. *Coord. Chem. Rev.* **1983**, *52*, 87–169.
- ¹⁵ Hathaway, B.; Billing, D. E. The Electronic Properties and Stereochemistry of Mono-Nuclear Complexes of the Copper (II) Ion. *Coord. Chem. Rev.* **1970**, *5*, 143–207.
- ¹⁶ Musinu, A.; Paschina, G.; Piccaluga, G.; Magini, M. Coordination of copper(II) in Aqueous Copper Sulfate Solution. *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 1184–1187.

- ¹⁷ Hathaway, B.; Duggan, M.; Murphy, A.; Mullane, J.; Power, C.; Walsh, A.; Walsh, B. The Stereochemistry and Electronic Properties of Fluxional Six-Coordinate Copper (II) Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **1981**, *36*, 267–324.
- ¹⁸ Tabbì, G.; Giuffrida, A.; Bonomo, R. P. Determination of Formal Redox Potentials in Aqueous Solution of copper(II) Complexes with Ligands Having Nitrogen and Oxygen Donor Atoms and Comparison with Their EPR and UV–Vis Spectral Features. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *128*, 137–145.
- ¹⁹ Patterson, G. S.; Holm, R. H. Structural and Electronic Effects on the Polarographic Half-Wave Potentials of Copper (II) Chelate Complexes. *Bioinorg. Chem.* **1975**, *4*, 257–275.
- ²⁰ Hathaway, B. J. The Evidence for “out-of-the-Plane” Bonding in Axial Complexes of the Copper (II) Ion. *Inorg. Chem.* **1973**, 49–67.
- ²¹ Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 4829–4833.
- ²² Roger, M.; Lima, L. M. P.; Frindel, M.; Platas-Iglesias, C.; Gestin, J.-F.; Delgado, R.; Patinec, V.; Tripier, R. Monopicolinate-Dipicolyl Derivative of Triazacyclononane for Stable Complexation of Cu²⁺ and ⁶⁴Cu²⁺. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5246–5259.
- ²³ Esteves, C. V.; Lamosa, P.; Delgado, R.; Costa, J.; Désogère, P.; Rousselin, Y.; Goze, C.; Denat, F. Remarkable Inertness of Copper(II) Chelates of Cyclen-Based Macrobicycles with Two *trans* - *N*-Acetate Arms. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5138–5153.
- ²⁴ Bottomley, G. A.; Clark, I. J.; Creaser, I. I.; Engelhardt, L. M.; Geue, R. J.; Hagen, K. S.; Harrowfield, J. M.; Lawrance, G. A.; Lay, P. A.; Sargeson, A. M.; et al. The Synthesis and Structure of Encapsulating Ligands: Properties of Bicyclic Hexamines. *Aust. J. Chem.* **1994**, *47*, 143–179.
- ²⁵ Bartholomä, M. D. Recent Developments in the Design of Bifunctional Chelators for Metal-Based Radiopharmaceuticals Used in Positron Emission Tomography. *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *389*, 36–51.
- ²⁶ Shokeen, M.; J. Wadas, T. The Development of Copper Radiopharmaceuticals for Imaging and Therapy. *Med. Chem.* **2011**, *7*, 413–429.
- ²⁷ Shokeen, M.; Anderson, C. J. Molecular Imaging of Cancer with Copper-64 Radiopharmaceuticals and Positron Emission Tomography (PET). *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 832–841.
- ²⁸ Smissman, E. E.; Ruenitz, P. C. 7-Aza Analogs of the Analgetic Agent Azabicyclane. Synthesis and Pharmacologic Analysis. *J. Med. Chem* **1976**, *19*, 184–186.
- ²⁹ Steiner, R.; Chavkin, C.; Clifton, D.; Reed, S.; Navarro, V. Methods and Compositions for Treating Vasomotor Symptoms. WO2014089019 (A1), June 12, **2014**.

- ³⁰ Yamaotsu, N.; Fujii, H.; Nagase, H.; Hirono, S. Identification of the Three-Dimensional Pharmacophore of K-Opioid Receptor Agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4446–4452.
- ³¹ Oronsky, B.; Oronsky, N. Combination Therapy for Bipolar Disorder. WO2009126931 (A2), October 15, **2009**.
- ³² Singh, N.; Nolan, T. L.; McCurdy, C. R. Chemical Function-Based Pharmacophore Development for Novel, Selective Kappa Opioid Receptor Agonists. *J. Mol. Graph. Model.* **2008**, *27*, 131–139.
- ³³ Benyhe, S.; Márki, á.; Nachtsheim, C.; Holzgrabe, U.; Borsodi, A. Kappa-Receptor Selective Binding of Opioid Ligands with a Heterocyclic bicyclo[3.3.1]nonan-9-One Structure. *Acta Biol. Hung.* **2003**, *54*, 147–155.
- ³⁴ Holzgrabe, U.; Cambareri, A.; Kuhl, U.; Siener, T.; Brandt, W.; Straßburger, W.; Friderichs, E.; Englberger, W.; Kögel, B.; Haurand, M. Diazabicyclononanones, a Potent Class of Kappa Opioid Analgesics. *Il Farmaco* **2002**, *57*, 531–534.
- ³⁵ Stenhouse, J. *Ann. Chem. Pharm.* **1851**, *78*, 1-5.
- ³⁶ Brandt, W.; Drosihn, S.; Haurand, M.; Holzgrabe, U.; Nachtsheim, C. Search for the Pharmacophore in Kappa-Agonistic Diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-One-1,5-Diesters and Arylacetamides. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1996**, *329*, 311–323.
- ³⁷ Borsodi, A.; Benyhe, S.; Holzgrabe, U.; Márki, Á.; Nachtsheim, C. Structurally Novel Group of Ligands Selective for Kappa Opioid Receptors. *Regulatory Peptides* **1994**, *54*, 27–28.
- ³⁸ Kögel, B.; Christoph, T.; Friderichs, E.; Hennies, H.-H.; Matthiesen, T.; Schneider, J.; Holzgrabe, U. HZ2, a Selective Kappa-Opioid Agonist. *CNS Drug Rev.* **1998**, *4*, 54–70.
- ³⁹ Barnes, N. A.; Brooker, A. T.; Godfrey, S. M.; Mallender, P. R.; Pritchard, R. G.; Sadler, M. The Synthesis and Structural Characterisation of a Series of Hydrophobic Piperidones and Bispidones. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 1019–1030.
- ⁴⁰ Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonniere, L. J. Substitution-Assisted Stereochemical Control of Bispidone-Based Ligands. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 11167–11176.
- ⁴¹ Siener, T.; Holzgrabe, U.; Drosihn, S.; Brandt, W. Conformational and Configurational Behaviour of K-Agonistic 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonan-9-Ones—synthesis, Nuclear Magnetic Resonance Studies and Semiempirical PM3 Calculations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 1827–1834.
- ⁴² Kuhl, U.; Cambareri, A.; Sauber, C.; Sörgel, F.; Hartmann, R.; Euler, H.; Kirfel, A.; Holzgrabe, U. Synthesis, X-Ray Analysis and Spectroscopic Characterization of the Hemiaminal Cyclization Product from 2,4-Dipyridine Substituted 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonanone 1,5-Diesters. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 2083–2088.

- ⁴³ Kuhl, U.; von Korff, M.; Baumann, K.; Burschka, C.; Holzgrabe, U. Stereochemical Behaviour of K-Agonistic 2, 4-Dipyridin-2-Yl-3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonanones— influence of the Substituent in Position N 3. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 2037–2042.
- ⁴⁴ Holzgrabe, U.; Brandt, W. Mechanism of Action of the Diazabicyclononanone-Type K-Agonists. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1383–1389.
- ⁴⁵ Haller, R.; Unholzer, H. Substituierte 3, 7-Diaza-Bicyclo-[3, 3, 1]-Nonanole-(9). *Arch. Pharm.* **1971**, *304*, 654–659.
- ⁴⁶ Kuhl, U.; Englberger, W.; Haurand, M.; Holzgrabe, U. Diazabicyclo [3.3. 1] Nonanone-Type Ligands for the Opioid Receptors. *Arch. Pharm.* **2000**, *333*, 226–230.
- ⁴⁷ Samhammer, A.; Holzgrabe, U.; Haller, R. Reduktionen an 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonan-9-Onen Und 1, 3-Diazaadamantan-6-onen1). *Arch. Pharm.* **1989**, *322*, 545–550.
- ⁴⁸ Siener, T.; Cambareri, A.; Kuhl, U.; Englberger, W.; Haurand, M.; Kögel, B.; Holzgrabe, U. Synthesis and Opioid Receptor Affinity of a Series of 2, 4-Diaryl-Substituted 3, 7-Diazabicyclononanones. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3746–3751.
- ⁴⁹ Comba, P.; Lienke, A. Bispidine Copper(II) Compounds: Effects of the Rigid Ligand Backbone. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 5206–5209.
- ⁵⁰ Börzel, H.; Comba, P.; Hagen, K. S.; Kerscher, M.; Pritzkow, H.; Schatz, M.; Schindler, S.; Walter, O. Copper-Bispidine Coordination Chemistry: Syntheses, Structures, Solution Properties, and Oxygenation Reactivity. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 5440–5452.
- ⁵¹ Börzel, H.; Comba, P.; Hagen, K. S.; Lampeka, Y. D.; Lienke, A.; Linti, G.; Merz, M.; Pritzkow, H.; Tsymbal, L. V. Iron Coordination Chemistry with Tetra-, Penta- and Hexadentate Bispidine-Type Ligands. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *337*, 407–419.
- ⁵² Comba, P.; Hauser, A.; Kerscher, M.; Pritzkow, H. Bond-Stretch Isomerism: Trapped Isomeric Structures of Hexacoordinate Copper (II) Bispidine Chromophores along a Jahn–Teller Active Vibrational Coordinate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4536–4540.
- ⁵³ Comba, P.; Wadepohl, H.; Wiesner, S. Optimization of the Efficiency of Oxidation Catalysts Based on Iron Bispidine Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *2011*, 2610–2615.
- ⁵⁴ Comba, P.; Lopez de Laorden, C.; Pritzkow, H. Tuning the Properties of Copper (II) Complexes with Tetra- and Pentadentate Bispidine (= 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonane) Ligands. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 647–664.
- ⁵⁵ Bleiholder, C.; Börzel, H.; Comba, P.; Ferrari, R.; Heydt, M.; Kerscher, M.; Kuwata, S.; Laurenczy, G.; Lawrance, G. A.; Lienke, A.; et al. Coordination Chemistry of a New Rigid, Hexadentate Bispidine-Based Bis (amine) Tetrakis (pyridine) Ligand. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8145–8155.
- ⁵⁶ Bentz, A.; Comba, P.; Deeth, R. J.; Kerscher, M.; Seibold, B.; Wadepohl, H. Modeling of the Various Minima on the Potential Energy Surface of Bispidine Copper(II) Complexes: A Further Test for Ligand Field Molecular Mechanics. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 9518–9527.

- ⁵⁷ Atanasov, M.; Comba, P.; Martin, B.; Müller, V.; Rajaraman, G.; Rohwer, H.; Wunderlich, S. DFT Models for copper(II) Bispidine Complexes: Structures, Stabilities, Isomerism, Spin Distribution, and Spectroscopy. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1263–1277.
- ⁵⁸ Lesma, G.; Pilati, T.; Sacchetti, A.; Silvani, A. New Chiral Diamino Ligands as Sparteine Analogues. Application to the Palladium-Catalyzed Kinetic Oxidative Resolution of 1-Phenyl Ethanol. *Tetrahedron Asymmetr.* **2008**, *19*, 1363–1366.
- ⁵⁹ Comba, P.; Morgen, M.; Wadepohl, H. Tuning of the Properties of Transition-Metal Bispidine Complexes by Variation of the Basicity of the Aromatic Donor Groups. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 6481–6501.
- ⁶⁰ Comba, P.; Hunoldt, S.; Morgen, M.; Pietzsch, J.; Stephan, H.; Wadepohl, H. Optimization of Pentadentate Bispidines as Bifunctional Chelators for ⁶⁴Cu Positron Emission Tomography (PET). *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 8131–8143.
- ⁶¹ Busche, C.; Comba, P.; Mayboroda, A.; Wadepohl, H. Novel RuII Complexes with Bispidine-Based Bridging Ligands: Luminescence Sensing and Photocatalytic Properties. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010*, 1295–1302.
- ⁶² Grosshauser, M.; Comba, P.; Kim, J. Y.; Ohto, K.; Thuéry, P.; Lee, Y. H.; Kim, Y.; Harrowfield, J. Ferro- and Antiferromagnetic Coupling in a Chlorido-Bridged, Tetranuclear Cu(II) Complex. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 5662–5666.
- ⁶³ Kolanowski, J. L.; Jeanneau, E.; Steinhoff, R.; Hasserodt, J. Bispidine Platform Grants Full Control over Magnetic State of Ferrous Chelates in Water. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8839–8849.
- ⁶⁴ Hage, R.; Lienke, J.; Petersen, P. Ligand and Complex for Catalytically Bleaching a Substrate. WO2003104379 A1, December 18, **2003**.
- ⁶⁵ Batchelor, S. N.; Dixon, S.; Parry, M. L.; Whiteoak, C. J. Shading Dye and Catalyst Combination. EP2228429 (A1), September 15, **2010**.
- ⁶⁶ Broere, D.; Laseur, Y.; Lienke, J.; Veerman-Petersen, P. Bleaching Composition. WO2005121296 (A1), December 22, **2005**.
- ⁶⁷ Appel, A. C. M.; Hage, R.; Hermant, R. M.; Lienke, J.; Veerman, S. M. Preserved Enhancement of Bleaching Catalyt. EP1369472 (A1), December 10, **2003**.
- ⁶⁸ Adriaanse, A.; Van, D.; Hage, R.; Ouwendijk, M.; Veerman, S. Liquid Cleaning Compositions and Their Use. WO02068574 (A1), September 6, **2002**.
- ⁶⁹ Appel, R.; Hage, R.; Van, D. H.; Lienke, J.; Smith, R. Enhancement of Air Bleaching Catalysts. WO0250229 (A1), June 27, **2002**.
- ⁷⁰ Boerzel, H.; Comba, P.; Hage, R.; Kerscher, M.; Lienke, J.; Merz, M. Ligand and Complex for Catalytically Bleaching a Substrate. WO0248301 (A1), June 20, **2002**.
- ⁷¹ Perkins, C. Transition Metal Bleaching Agents. WO0060045 (A1), October 12, **2000**.

- ⁷² Comba, P.; Nuber, B.; Ramlow, A. The Design of a New Type of Very Rigid Tetradentate Ligand. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 347–352.
- ⁷³ Comba, P.; Kanellakopulos, B.; Katsichtis, C.; Lienke, A.; Pritzkow, H.; Rominger, F. Synthesis and Characterisation of Manganese (II) Compounds with Tetradentate Ligands Based on the Bispidine Backbone. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 3997–4002.
- ⁷⁴ Bukowski, M. R.; Comba, P.; Lienke, A.; Limberg, C.; Lopez de Laorden, C.; Mas-Ballesté, R.; Merz, M.; Que, L. Catalytic Epoxidation and 1,2-Dihydroxylation of Olefins with Bispidine–Iron(II)/H₂O₂ Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3446–3449.
- ⁷⁵ Bukowski, M. R.; Comba, P.; Limberg, C.; Merz, M.; Que, L.; Wistuba, T. Bispidine Ligand Effects on Iron/Hydrogen Peroxide Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1283–1287.
- ⁷⁶ Jansen, J.; Hilker, I.; Hensen, G.; Silvestre, D. Resin Composition. WO2013083630 (A1), June 13, **2013**.
- ⁷⁷ Jansen, J. F. G. A.; Hensen, G. J. E. Multi-Component System. WO2013083632 (A1), June 13, **2013**.
- ⁷⁸ Kraeger, R.; Jansen, J. Unsaturated Polyester Resin or Vinyl Ester Resin Compositions. WO2011124282 (A1), October 13, **2011**.
- ⁷⁹ Comba, P.; Wadepohl, H.; Wunderlich, S. Oxidation versus Dioxygenation of Catechol: The Iron–Bispidine System. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *2011*, 5242–5249.
- ⁸⁰ Born, K.; Comba, P.; Daubinet, A.; Fuchs, A.; Wadepohl, H. Catecholase Activity of dicopper(II)-Bispidine Complexes: Stabilities and Structures of Intermediates, Kinetics and Reaction Mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 36–48.
- ⁸¹ Hage, R.; Gol, F.; Gibbs, H.; Maaijen, K. Antiskinning Compositions. WO2012093250 (A1), July 12, **2012**.
- ⁸² Hage, R.; Wesenhagen, P. Liquid Hardening. WO2008003652 (A1), January 10, **2008**.
- ⁸³ Comba, P.; Kuwata, S.; Linti, G.; Pritzkow, H.; Tarnai, M.; Wadepohl, H. Oxidative N-Dealkylation in cobalt-bispidine-H₂O₂ Systems. *Chem. Comm.* **2006**, 2074.
- ⁸⁴ Comba, P.; Kuwata, S.; Linti, G.; Tarnai, M.; Wadepohl, H. Synthesis and Oxidation of Vanadyl Complexes Containing Bispidine Ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 657–664.
- ⁸⁵ Haberberger, M.; Someya, C. I.; Company, A.; Irran, E.; Enthaler, S. Application of a Nickel-Bispidine Complex as Pre-Catalyst for C(sp²)–C(sp³) Bond Formations. *Catal. Lett.* **2012**, *142*, 557–565.
- ⁸⁶ Benet-Buchholz, J.; Comba, P.; Llobet, A.; Roeser, S.; Vadivelu, P.; Wadepohl, H.; Wiesner, S. Iron vs. Ruthenium—a Comparison of the Stereoselectivity in Catalytic Olefin Epoxidation. *Dalton Trans.* **2009**, 5910.

- ⁸⁷ Touti, F.; Maurin, P.; Hasserodt, J. Magnetogenese Unter Physiologischen Bedingungen Mit Molekularen Sonden, Die Auf (bio-) Chemische Analyten Ansprechen. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *125*, 4752–4756.
- ⁸⁸ Halder, G. J.; Kepert, C. J.; Moubaraki, B.; Murray, K. S.; Cashion, J. D. Guest-Dependent Spin Crossover in a Nanoporous Molecular Framework Material. *Science* **2002**, *298*, 1762–1765.
- ⁸⁹ Feig, A. L.; Lippard, S. J. Reactions of Non-Heme Iron (II) Centers with Dioxygen in Biology and Chemistry. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 759–805.
- ⁹⁰ Touti, F.; Singh, A. K.; Maurin, P.; Canaple, L.; Beuf, O.; Samarut, J.; Hasserodt, J. An Electroneutral Macrocyclic Iron (II) Complex That Enhances MRI Contrast in Vivo. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4274–4278.
- ⁹¹ Anastasi, A. E.; Comba, P.; McGrady, J.; Lienke, A.; Rohwer, H. Electronic Structure of Bispidine Iron(IV) Oxo Complexes. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6420–6426.
- ⁹² Bautz, J.; Comba, P.; Que, L. Spin-Crossover in an Iron(III)–Bispidine–Alkylperoxide System. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 7077–7082.
- ⁹³ Atanasov, M.; Busche, C.; Comba, P.; El Hallak, F.; Martin, B.; Rajaraman, G.; van Slageren, J.; Wadepohl, H. Trinuclear {M1}CN{M2}2 Complexes (M1 = CrIII, FeIII, CoIII; M2 = CuII, NiII, MnII). Are Single Molecule Magnets Predictable? *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 8112–8125.
- ⁹⁴ Atanasov, M.; Comba, P.; Helmle, S.; Müller, D.; Neese, F. Zero-Field Splitting in a Series of Structurally Related Mononuclear NiII–Bispidine Complexes. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 12324–12335.
- ⁹⁵ Comba, P.; Kerscher, M.; Merz, M.; Müller, V.; Pritzkow, H.; Remenyi, R.; Schiek, W.; Xiong, Y. Structural Variation in Transition-Metal Bispidine Compounds. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5750–5760.
- ⁹⁶ Börzel, H.; Comba, P.; Katsichtis, C.; Kiefer, W.; Lienke, A.; Nagel, V.; Pritzkow, H. Stabilization of Copper Dioxygen Compounds: Design, Synthesis, and Characterization. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1716–1721.
- ⁹⁷ Comba, P.; Martin, B.; Prikhod'ko, A.; Pritzkow, H.; Rohwer, H. Structural Variation in the copper(II) Complexes with a Tetradentate Bis-6-Methylpyridine-Substituted Bispidine Ligand. *CR Chimie* **2005**, *8*, 1506–1518.
- ⁹⁸ Comba, P.; Merz, M.; Pritzkow, H. Catalytic Aziridination of Styrene with Copper Complexes of Substituted 3,7-Diazabicyclo[3.3.1]nonanones. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, *2003*, 1711–1718.
- ⁹⁹ Comba, P.; Lang, C.; de Laorden, C. L.; Muruganatham, A.; Rajaraman, G.; Wadepohl, H.; Zajaczkowski, M. The Mechanism of the (Bispidine)copper(II)-Catalyzed Aziridination of Styrene: A Combined Experimental and Theoretical Study. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5313–5328.

- ¹⁰⁰ Born, K.; Comba, P.; Ferrari, R.; Lawrance, G. A.; Wadepohl, H. Stability Constants: A New Twist in Transition Metal Bispidine Chemistry. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 458–464.
- ¹⁰¹ Born, K.; Comba, P.; Kerscher, M.; Linti, G.; Pritzkow, H.; Rohwer, H. Distortional Isomerism with Copper (I) Complexes of 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonane Derivatives. *Dalton Trans.* **2009**, 362–367.
- ¹⁰² Börzel, H.; Comba, P.; Hagen, K. S.; Katsichtis, C.; Pritzkow, H. A Copper(I) Oxygenation Precursor in the Entatic State: Two Isomers of a Copper(I) Compound of a Rigid Tetradentate Ligand. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 914–919.
- ¹⁰³ Atanasov, M.; Comba, P.; Helmle, S. Cyanide-Bridged FeIII–CuII Complexes: Jahn–Teller Isomerism and Its Influence on the Magnetic Properties. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 9357–9368.
- ¹⁰⁴ Lee, Y. H.; Kim, M.; Woo, A. R.; Choi, J. Y.; Byun, J. C.; Harrowfield, J. M.; Lim, W. T.; Thuéry, P.; Kim, Y. Small-Ring Heterocycles as Components of Multidentate Ligands: Some Structural Studies Relating to Ring Opening. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *71*, 395–407.
- ¹⁰⁵ Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. Hexadentate Bispidine Derivatives as Versatile Bifunctional Chelate Agents for Copper(II) Radioisotopes. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 347–359.

**Chapitre II : Synthèse de
ligands pentadentates de type
bispidine**

1. Ligands cibles

Le but est d'obtenir des ligands bispidines avec différentes sphères de complexation afin d'étudier l'influence lors de la coordination du cuivre(II). Les ligands pentadentates cibles sont décrits ci-dessous (Figure 2. 1).

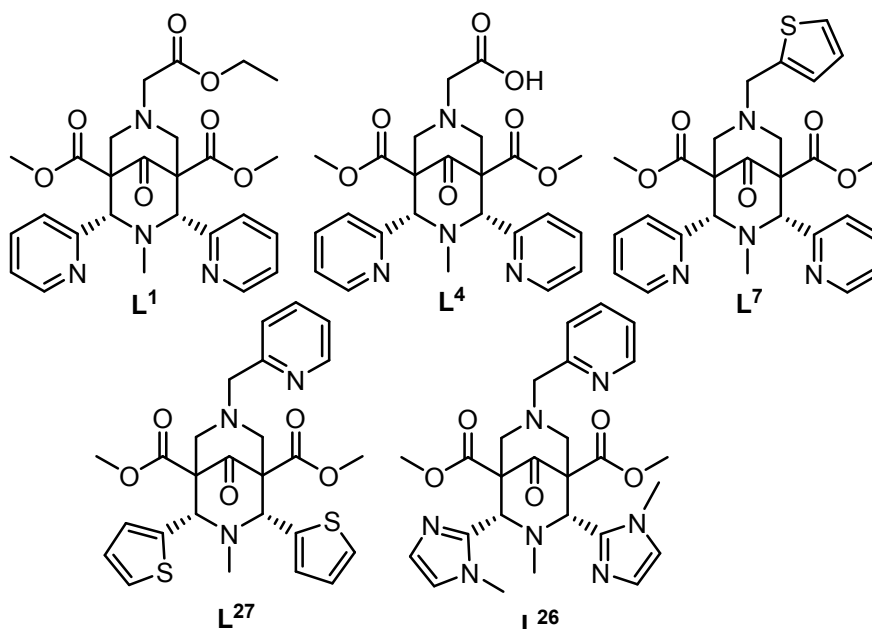


Figure 2. 1: Structure des ligands pentadentates cibles.

Nous avons cherché à introduire différents cycles aromatiques sur la pipéridinone ainsi que différentes fonctions coordinantes en position R₂ lors de la 2^{ème} étape de synthèse. L'intérêt du groupement en R₂ est de permettre l'introduction de différentes fonctions coordinantes. Ces fonctions possèdent différents pK_a qui pourront influencer la complexation du métal. En effet, dans le cas du ligand L⁷, le motif thiophène n'a pas de groupement protonable (pK_a = 33), contrairement au ligand L⁴ qui possède un acide carboxylique et aux ligands L²⁶ et L²⁷ possédant une pyridine. En effet, nous avons vu dans l'introduction que les pK_as gouvernaient les propriétés thermodynamiques de ces ligands : les constantes de complexation aux métaux, et dans le cas du Cu(II), le potentiel d'oxydo-réduction.¹

La synthèse de ces ligands pentadentates de type bispidine consiste en une double réaction de Mannich² (Schéma 2. 1).

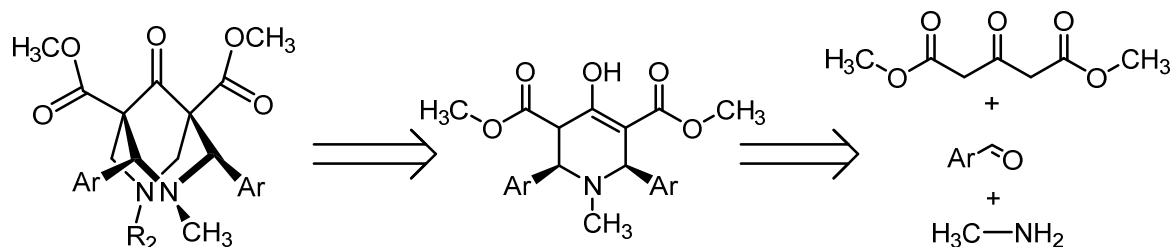


Schéma 2. 1: Schéma rétro-synthétique de la bispidone.

Dans cette partie, nous allons tout d'abord développer la synthèse des différents précurseurs et des ligands. Leur optimisation sera ensuite développée, à savoir la réduction de la cétone centrale afin de stabiliser la molécule et la saponification des fonctions esters afin d'augmenter la solubilité des ligands en milieu aqueux. Enfin, nous nous attarderons sur la caractérisation structurale (par RMN) qui a permis l'étude et la détermination de la configuration absolue des bispidines.

2. Synthèse des précurseurs

a) Synthèse du précurseur P₁

La synthèse du précurseur pipéridinone P₁ a été décrite pour la première fois en 1964 par Knabe et Ruppenthal³ (Schéma 2. 2).

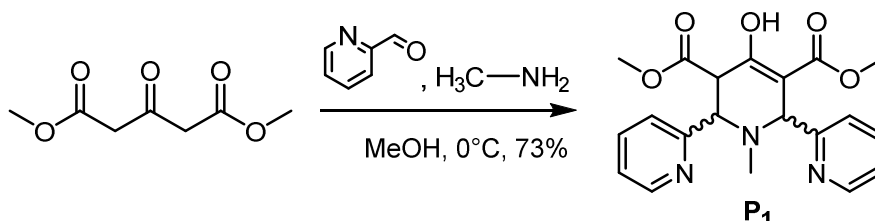


Schéma 2. 2: Synthèse du précurseur P₁.

Cette synthèse est le résultat d'une réaction de Mannich, permettant d'obtenir, en une seule étape, une molécule de type pipéridinone, le diméthyl-1-méthyl-4-oxo-2,6-dipyridin-2-yl-3,5-dicarboxylate. Des essais de séparation sur plaque chromatographique sur couche mince, montre qu'une purification n'est pas possible dans ces conditions. En effet, la migration du produit donne une « trainée » dans laquelle il est difficile de distinguer les différentes espèces. Pour purifier nos précurseurs, des recristallisations dans le méthanol ont donc été effectuées⁴ ; le précurseur est alors obtenu sous la forme d'un mélange de différents isomères sous différentes conformations^{5,6} (Figure 2. 2).

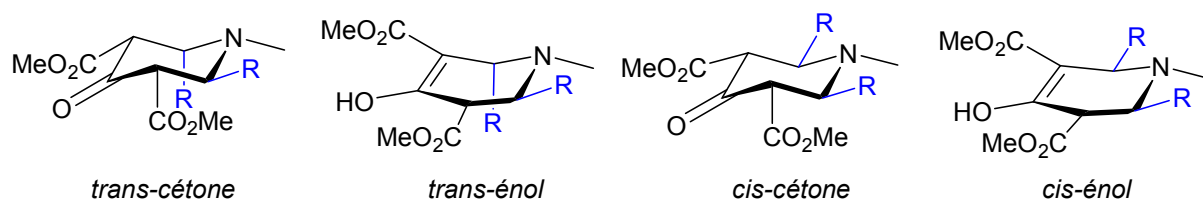


Figure 2. 2: Conformations du précurseur P_1 .

En effet, la fonction cétone de la pipéridinone possède deux protons en position α , ce qui peut induire des formes tautomériques céto-énoliques. De plus, les différentes conformations du cycle pipéridinone dépendent de la substitution des groupements R (ici des groupements aromatiques pyridines), qui peuvent être en position axiale ou équatoriale, donnant des conformations *cis* ou *trans*. Au total, il existe donc quatre conformations différentes possibles, dont les proportions varient selon les synthèses.

Dans ses travaux en 1992⁶, Holzgrabe a montré par la synthèse de plusieurs précurseurs pipéridinones, que trois formes étaient obtenues (*cis*-cétone, *cis*-énol et *trans*-énol) et qu'il n'y avait pas de forme *trans*-cétone car cette dernière forme est la moins favorable thermodynamiquement. Holzgrabe a également montré que la proportion de ces trois formes va dépendre du solvant dans lequel elles se trouvent. En effet, dans le cas d'un solvant apolaire aprotique (ex : CDCl_3), on tendra vers des formes *cis* exclusivement, tandis que dans le cas d'un solvant polaire protique (ex : MeOH), on tendra vers un équilibre entre la *cis*-cétone et le *trans*-énol (majoritaire) au bout de plusieurs jours. Le solvant a donc une influence sur les proportions des différentes conformations obtenues.

Dans notre cas, comme la synthèse ainsi que la recristallisation sont effectuées dans le méthanol, l'hypothèse sur laquelle nous nous basons est que les formes *trans*-énol ou *cis*-cétone seront les produits majoritaires. Dans le cas du spectre RMN ^1H ci-dessous, les quatre isomères différents ont été obtenus, les deux formes majoritaires étant le *trans*-énol et la *cis*-cétone (Figure 2. 3, Figure 2. 4).

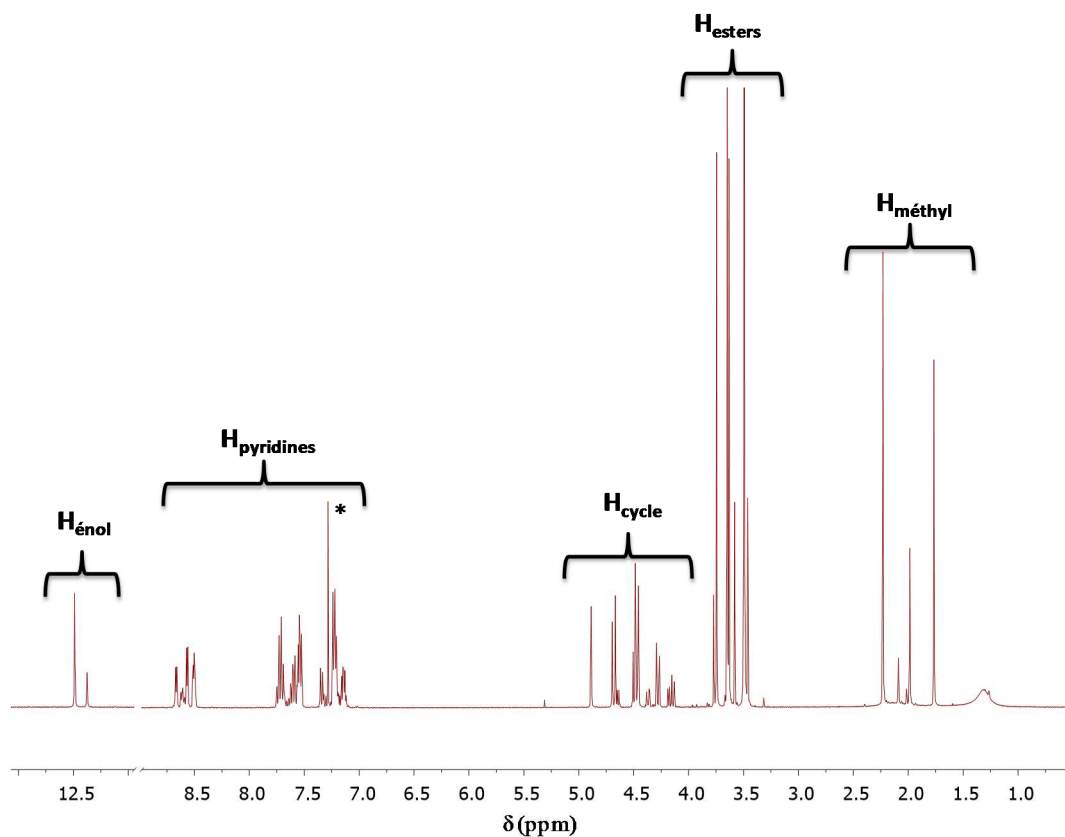


Figure 2. 3: Spectre RMN ^1H du précurseur P_1 ($^*\text{CDCl}_3$, 400 MHz).

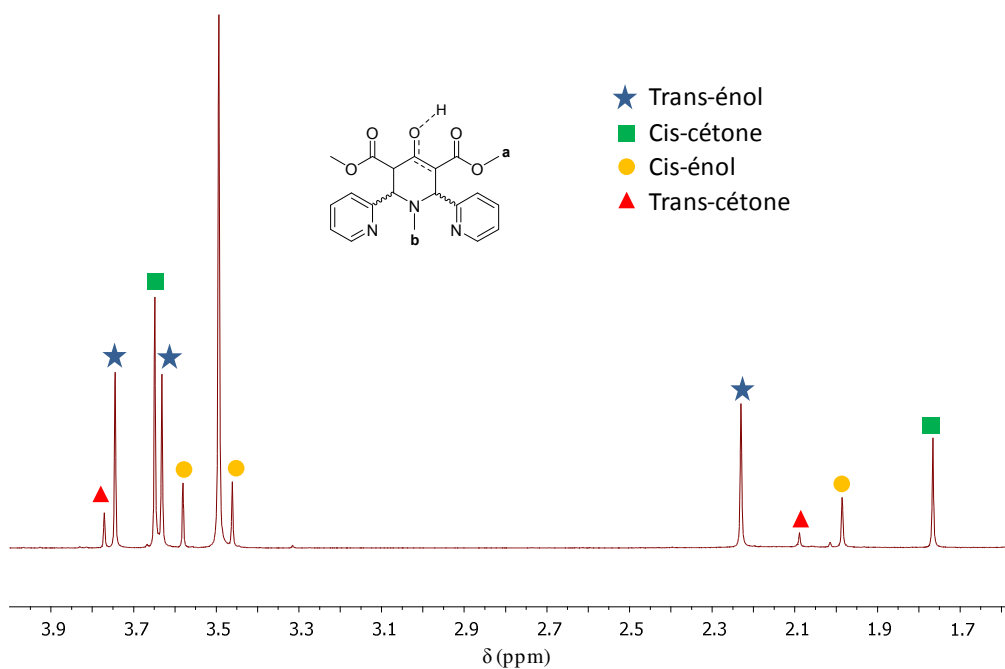


Figure 2. 4: Agrandissement de la partie aliphatique du spectre RMN ^1H du précurseur P_1 (4 conformations présentes) (CDCl_3 , 400 MHz).

Cependant, sur plusieurs synthèses du précurseur P¹, les proportions obtenues sont très variables (Tableau 2. 1).

Essais	Trans-énol	Trans-cétone	Cis-cétone	Cis-énol
1	60%	-	20%	20%
2	24%	8%	44%	24%
3	44%	7%	32%	17%
4	16%	4%	52%	28%

Tableau 2. 1: Proportions des différents isomères obtenus lors des synthèses de P₁.

Ces résultats sont en accord avec la littérature⁶ puisque l'on constate que les espèces majoritaires sont soit la *cis*-cétone, soit le *trans*-énol, cela dépendant du temps de la synthèse et de la (re)cristallisation. Plus le produit restera longtemps dans le méthanol, plus la proportion de *trans*-énol sera importante. De plus, dans les quatre cas, la proportion de *trans*-cétone est très minoritaire comme décrit par Holzgrabe.⁶

Afin d'obtenir un ligand bispidone en configuration *cis* avec de bons rendements, il semble préférable de partir d'un précurseur en configuration *cis* majoritairement. Sur la base des proportions de formes *cis* obtenues, on attend des rendements de 40 à 80% pour les bispidones synthétisées à partir de P₁. Cependant, certaines publications⁶ semblent montrer qu'il n'y a pas de corrélation entre la configuration de P₁ et celle de la bispidone et qu'une isomérisation est possible lors de la 2^{ème} étape de synthèse (Schéma 2. 3).

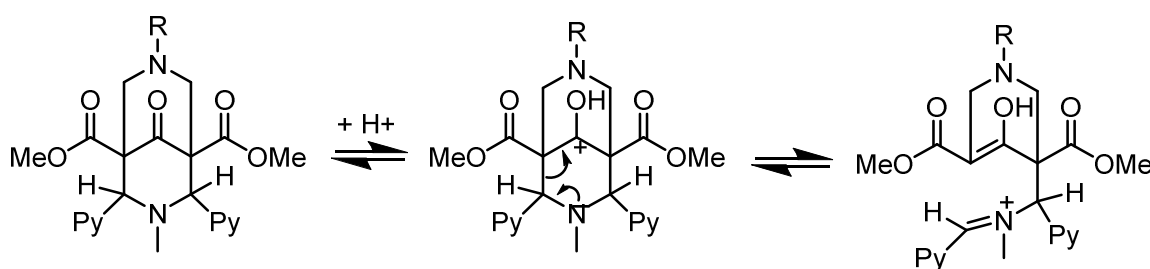


Schéma 2. 3: Processus d'ouverture de cycle des bispidones par rétro-Mannich.

Cette isomérisation consiste en une ouverture de cycle par réaction de rétro-Mannich.⁷ Nous discuterons par la suite de savoir si l'isomérisation s'effectue dans les cas de nos ligands et si elle est quantitative (les deux formes *trans* peuvent-elles donner une forme *cis* ?).

b) Synthèse du précurseur P₂

Le deuxième précurseur synthétisé comporte des motifs méthyl-imidazole à la place des pyridines, ainsi la molécule possède toujours trois amines pour la future coordination du métal

(Schéma 2. 4). Cette synthèse a été réalisée à partir du N-méthyl-2-imidazolecarboxaldehyde, préalablement synthétisé au laboratoire,^{8,9} selon le même schéma de synthèse que P₁.

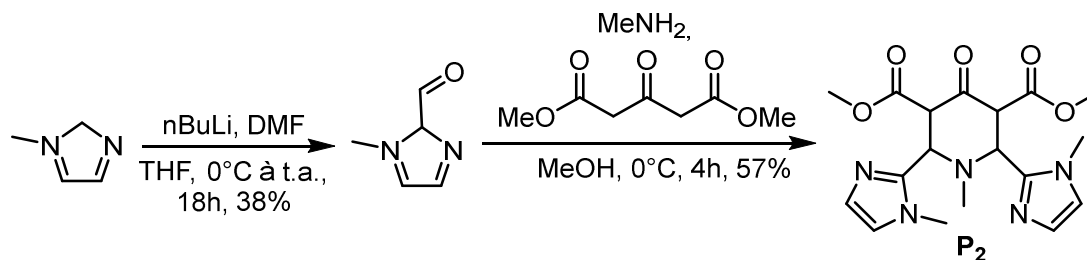


Schéma 2. 4: Synthèse du précurseur P₂.

Le précurseur P₂ a été obtenu sous la forme d'un mélange d'isomères de configuration : la forme *cis*-cétone et la forme *trans*-énol (34% et 66%, pourcentage déterminé par RMN ¹H) (Figure 2. 5, Figure 2. 6).

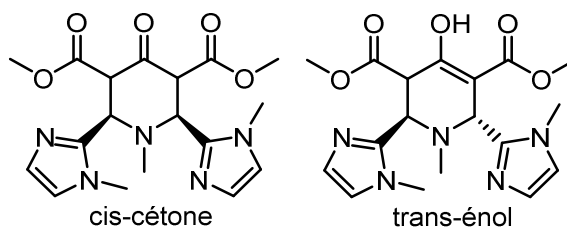


Figure 2. 5: Conformations du précurseur P₂ obtenu.

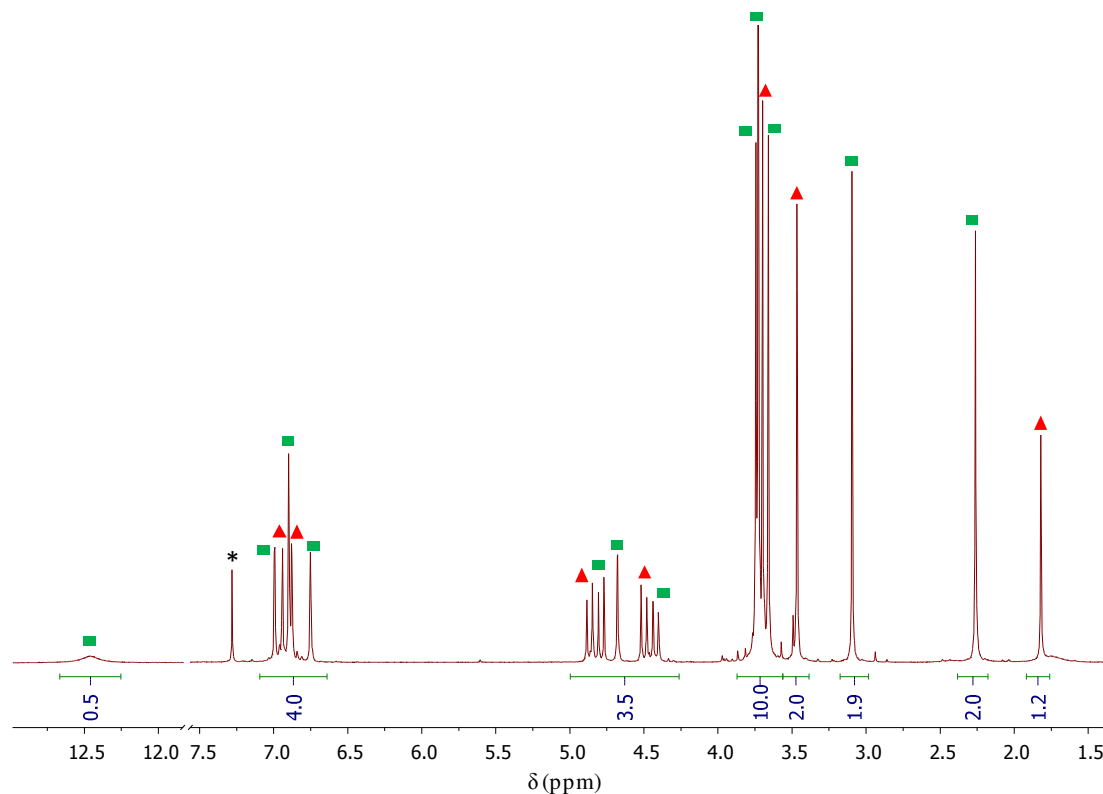


Figure 2. 6: Spectre RMN ¹H du précurseur P₂ (carrés verts: *trans*-énol; triangles rouges: *cis*-cétone, *CDCl₃, 300 MHz).

On remarque que les isomères obtenus sont bien les plus stables dans le méthanol. 6 D'après la proportion non négligeable de forme *cis*, on devrait théoriquement obtenir le ligand souhaité dans la bonne configuration.

c) Synthèse du précurseur P₃

Une troisième voie de synthèse a également été explorée qui implique le motif thiophène comme substituant à la place des pyridines. Le schéma de synthèse reste toujours le même (Schéma 2. 5), à partir de produits commerciaux, et la molécule a pu être obtenue de façon très minoritaire (rendement de 3%). De plus, la pipéridinone était exclusivement sous la forme *trans*-énol, ce qui ne semble pas favorable pour la formation d'une bispidine en *cis*.

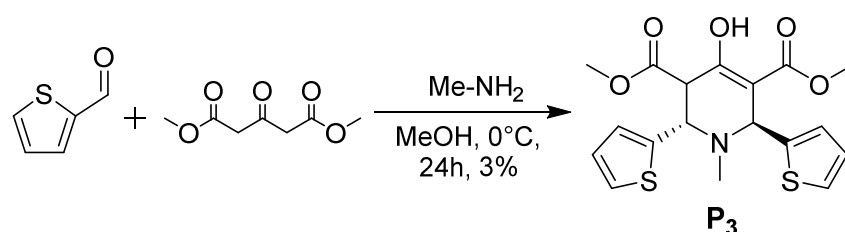


Schéma 2. 5: Synthèse du précurseur P₃.

Les conditions de synthèse ont donc été modifiées afin d'essayer d'obtenir une forme *cis* du précurseur avec un meilleur rendement. Nous avons alors remarqué un problème au niveau de la réactivité lors de cette étape. En effet, lors des nombreux essais (Tableau 2. 2), le produit majoritairement obtenu n'était pas celui attendu mais une espèce secondaire non-cyclisée.

Ordre d'ajout des réactifs ((1) aldéhyde + (2) amine + (3) diester)	Solvant	Température	Remarques
3+1 puis 2	MeOH	0°C	Faible quantité de <i>trans</i> -énol obtenue
3+1 puis 2	THF	0°C	Produit secondaire majoritaire
3+1 puis 2	CH ₂ Cl ₂	0°C	Produit secondaire majoritaire
3+1 puis 2	CH ₂ Cl ₂	t.a.	Produit secondaire majoritaire
2+1 puis 3	MeOH	0°C	Produit secondaire majoritaire - Problème de solubilité
2+1 puis 3	CH ₂ Cl ₂	0°C puis t.a.	Produit secondaire majoritaire
1+2 (1 ^{ère} étape)	CH ₂ Cl ₂	0°C-t.a.-50°C	Obtention imine
+3 (2 ^{ème} étape) + NEt ₃	CHCl ₃	t.a.	Ajout imine goutte à goutte => ne réagit pas

Tableau 2. 2: Récapitulatif des essais de synthèse du précurseur P₃.

Pour les premiers essais, nous avons décidé de tester différents solvants et températures. Le même produit secondaire a été obtenu (Figure 2. 7). Celui-ci a été caractérisé par spectrométrie de masse et RMN ^1H , et nous avons constaté que le thiophène aldéhyde était très réactif. Sachant que l'amine n'était ajoutée qu'en dernier dans le milieu réactionnel, la réaction était déjà bien avancée, ce qui explique pourquoi l'espèce attendue est en proportion largement minoritaire. D'après le produit obtenu, il semblerait que l'aldéhyde réagisse directement sur le diester sans former d'imine. Un deuxième ester viendrait ensuite réagir sur la double liaison formée (Schéma 2. 6). Enfin, après attaque de la cétone du deuxième ester et déshydratation, on obtient le deuxième produit secondaire caractérisé sous sa forme énol.

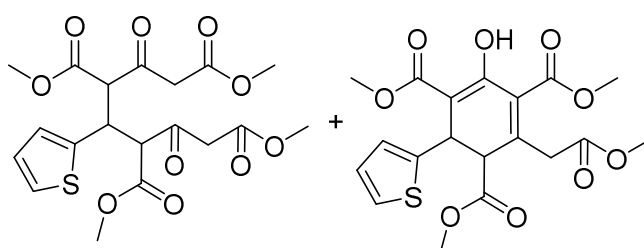


Figure 2. 7: Espèces secondaires obtenues lors de la synthèse de P_3 .

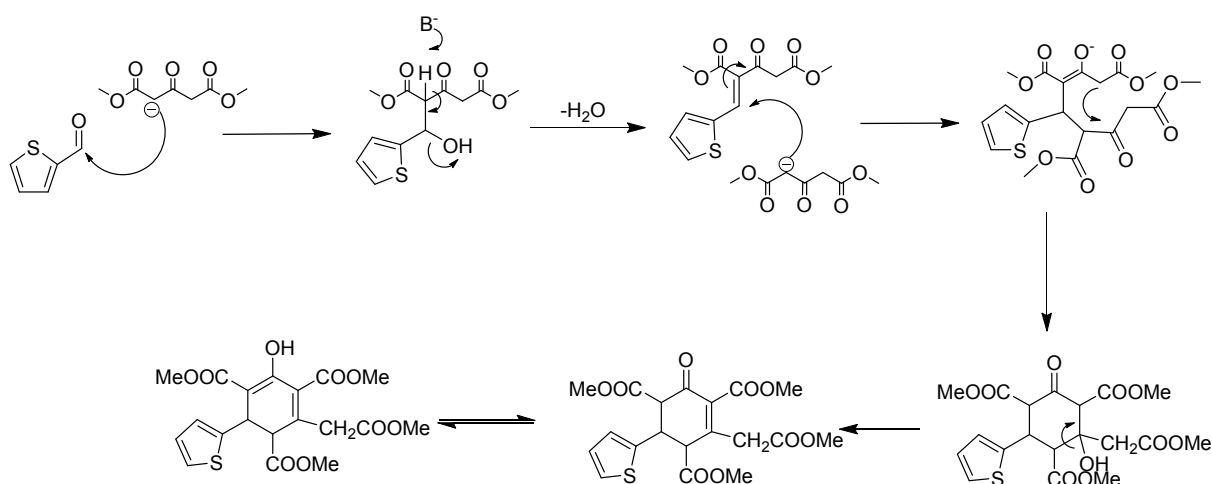


Schéma 2. 6: Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des espèces secondaires lors de la synthèse du précurseur P_3 .

Nous avons donc décidé de modifier l'ordre d'ajout des réactifs afin que l'amine puisse réagir avant (deuxième partie du tableau). Cela n'a pas amélioré la réaction, puisque le produit obtenu n'a encore pu être obtenu qu'en très faible quantité. Une synthèse en deux étapes a alors été tentée afin de s'affranchir de la forte réactivité du thiophène-aldéhyde avec le diester (troisième partie du tableau). L'imine thiophène a pu être obtenue mais celle-ci n'a pas réagi avec le diester lors de la seconde étape (Schéma 2. 7). En effet, la différence d'électronégativité entre les deux groupements pyridine et thiophène se trouve être très importante ($\text{eln}(\text{N}) = 3,0 > \text{eln}(\text{S}) = 2,5$).¹⁰

La pyridine va apporter un caractère électroattracteur à l'imine, tandis que le thiophène va le rendre électrodonneur grâce à la délocalisation des doublets non-liants du soufre.

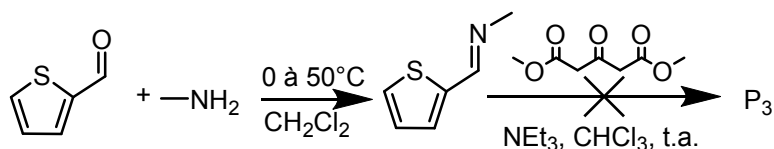


Schéma 2. 7: Synthèse en deux étapes du précurseur P₃.

Le précurseur P₃ n'a donc pas pu être obtenu en quantité suffisante pour poursuivre la synthèse.

3. Synthèse des bispidones

a) Synthèse du ligand L¹

Le ligand L¹ a été synthétisé à partir du précurseur P₁ (Figure 2. 8).

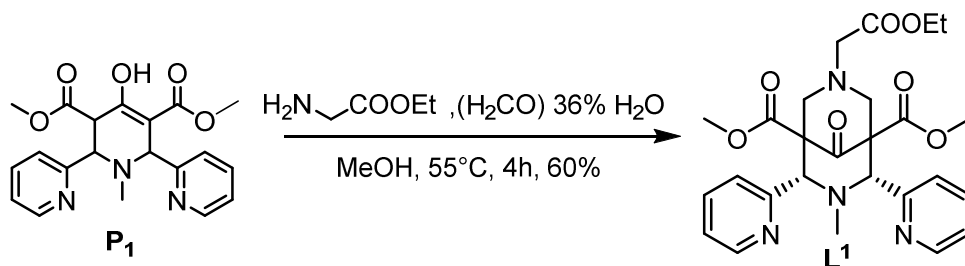


Figure 2. 8: Synthèse du ligand L¹.

Le but était d'obtenir en position R₂ une fonction ester éthylique, qui serait hydrolysée par la suite afin d'obtenir un acide carboxylique pour la complexation du cuivre(II).

Le produit est obtenu par cristallisation et est purifié par recristallisation dans le méthanol sous la forme de cristaux blancs.⁴ Tout comme le précurseur, le ligand de type bispidone peut présenter différentes conformations (chap. I). Dans le cas du ligand L¹, c'est la conformation chaise-chaise qui est obtenue lors de la purification. En plus, de ces différentes conformations au niveau du bicyclic, deux types de configurations peuvent être observés au niveau des pyridines : *cis* et *trans*.⁷

Des calculs DFT ont été effectués sur ce ligand L¹,¹¹ en collaboration avec le Dr Carlos Platas Iglesias (Université de la Corogne), et ont montré que la conformation la plus stable était l'isomère *cis* ($\Delta G^{\circ}_{cis-trans} = -0,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$). D'après les modélisations effectuées, cette conformation serait préférentielle en partie à cause de la présence d'une interaction entre l'oxygène de la liaison C=O de l'ester et un hydrogène de la pyridine (Figure 2. 9). Cette

interaction serait plus importante que celle présente dans l'isomère *trans*, entre le même oxygène de l'ester et les protons H₆ et H₈ en position axiale.

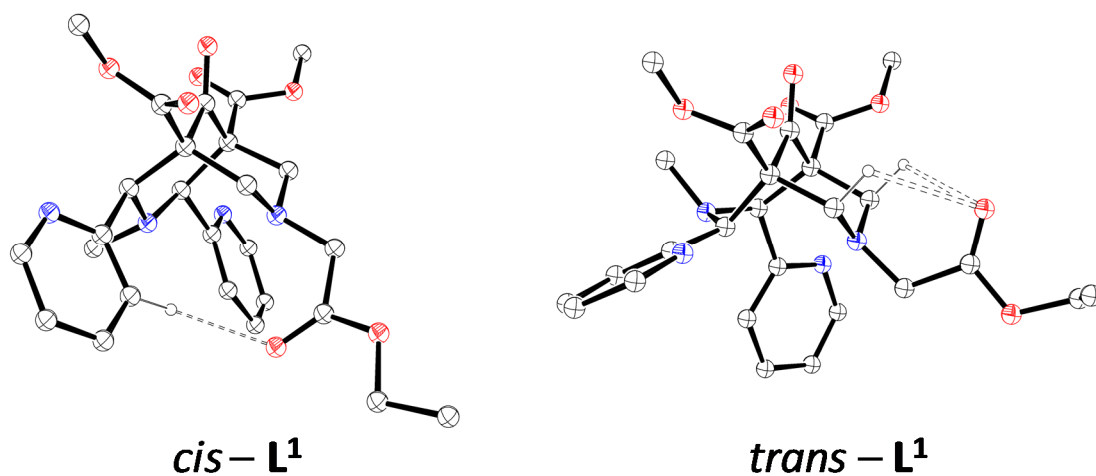


Figure 2. 9: Géométries moléculaires modélisées des isomères *cis* et *trans* du ligand L¹ (optimisation avec TPSSH/6-311G(d,p)).

Ces études théoriques sur plusieurs ligands acétate ont permis de constater que l'encombrement stérique dû aux substituants n'est donc pas le seul paramètre influençant la conformation du ligand.

La structure cristallographique du ligand L¹ a pu être obtenue et montre bien la conformation chaise-chaise avec les pyridines en configuration *cis*^{7,12,13} (Figure 2. 10).

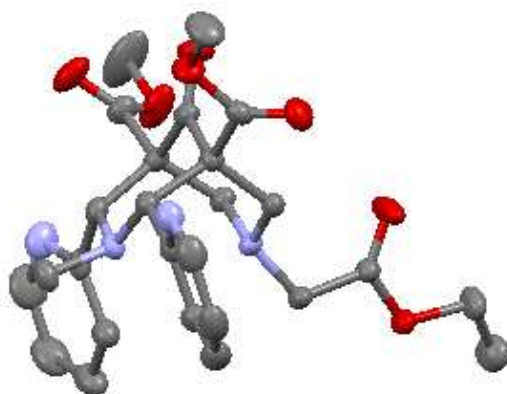


Figure 2. 10: Structure cristallographique du ligand L¹.

Cette structure peut être mise en corrélation avec les études RMN effectuées sur le ligand (Figure 2. 11, Figure 2. 12).

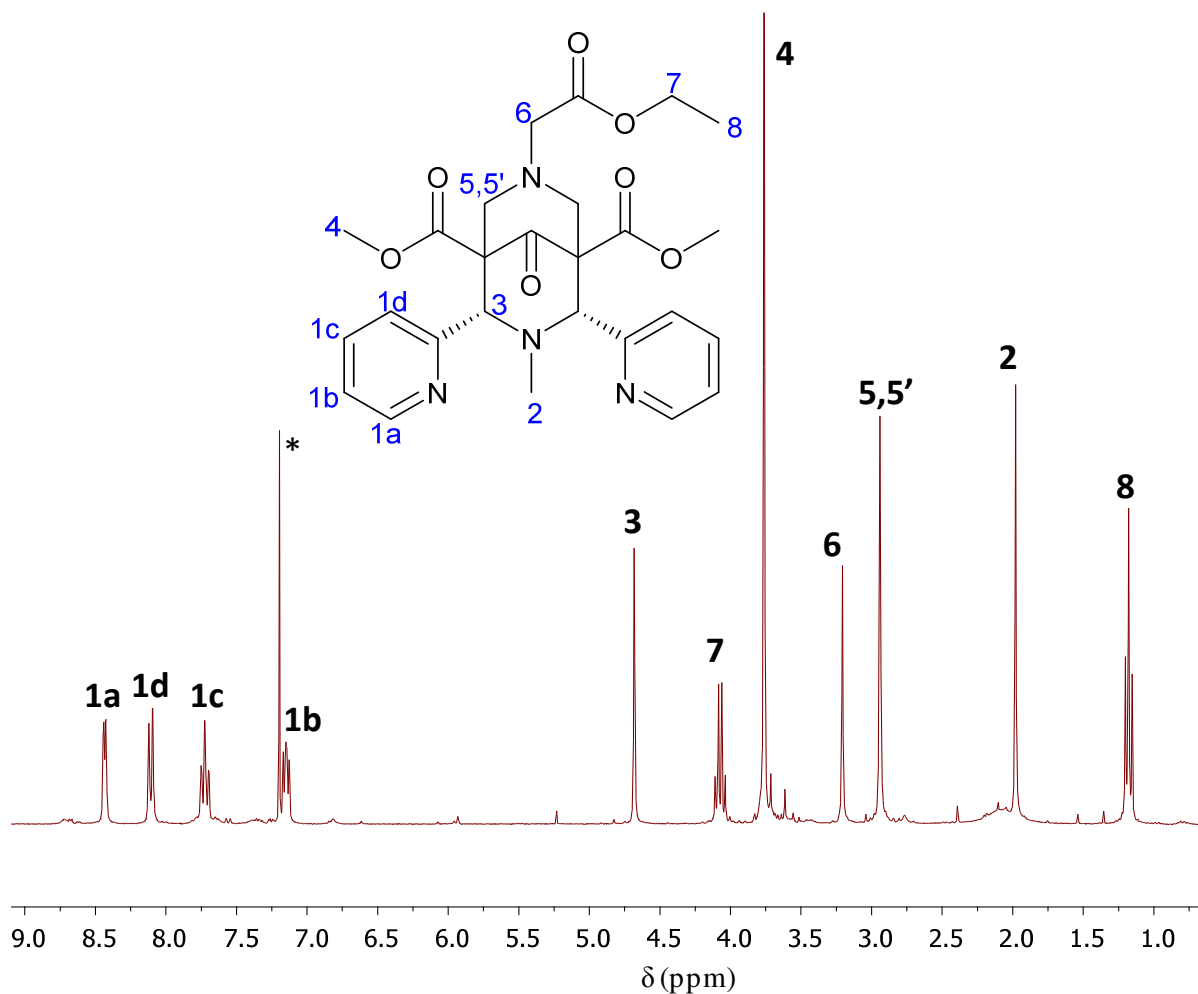


Figure 2. 11: Spectre RMN ¹H du ligand L¹ (300 MHz, *CDCl₃).

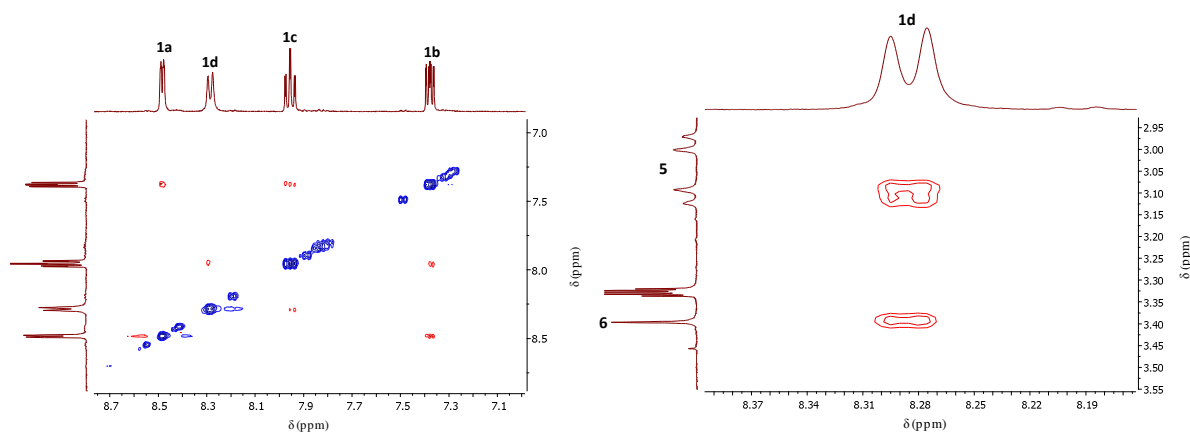


Figure 2. 12: Spectres NOESY du ligand L¹ (400 MHz, CD₃OD).

En effet, les spectres RMN indiquent bien l'obtention d'une molécule symétrique. De plus, on peut voir le couplage NOE entre les protons H_{1d} et les protons H₅ et H₆. Ceci est en accord avec la structure cristallographique montrant la proximité entre ces différents protons (distances :

$H_{1d}-H_6 = 2,844$ et $3,048$ Å et $H_{1d}-H_5 = 2,648$ et $3,095$ Å). Dans le cas du ligand L^1 , seul l'isomère *cis* a été isolé. Le rendement obtenu comparé à la proportion de forme *cis* présente dans le précurseur de départ, indique qu'il ne semble pas y avoir de réisomérisation de la forme *trans* en forme *cis* au cours de la réaction, contrairement aux hypothèses formulées dans la littérature.⁴ Ceci est en accord avec les précédents travaux du laboratoire,¹² qui montraient qu'en partant d'un précurseur *trans* exclusivement, on obtenait le ligand *trans* également.

b) Synthèse du ligand L^{26}

Une fois le précurseur P_2 obtenu, nous avons poursuivi par la synthèse de la bispidine comportant un groupement méthylpyridine en position R_2 (Schéma 2. 8).

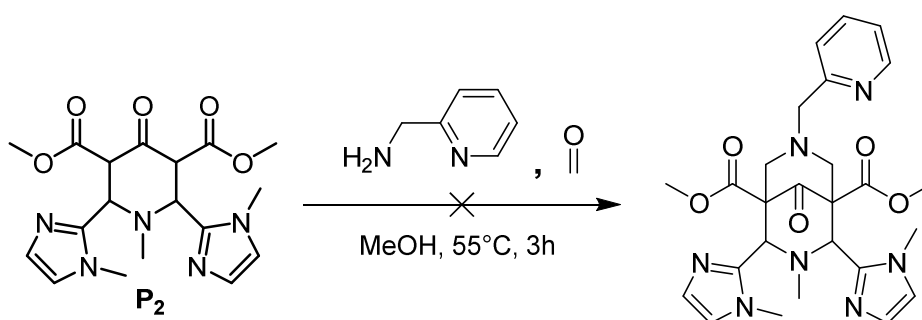


Schéma 2. 8: Synthèse du ligand L^{26} .

Après purification sur colonne, le spectre RMN 1H semble montrer une espèce majoritaire dissymétrique (Figure 2. 13).

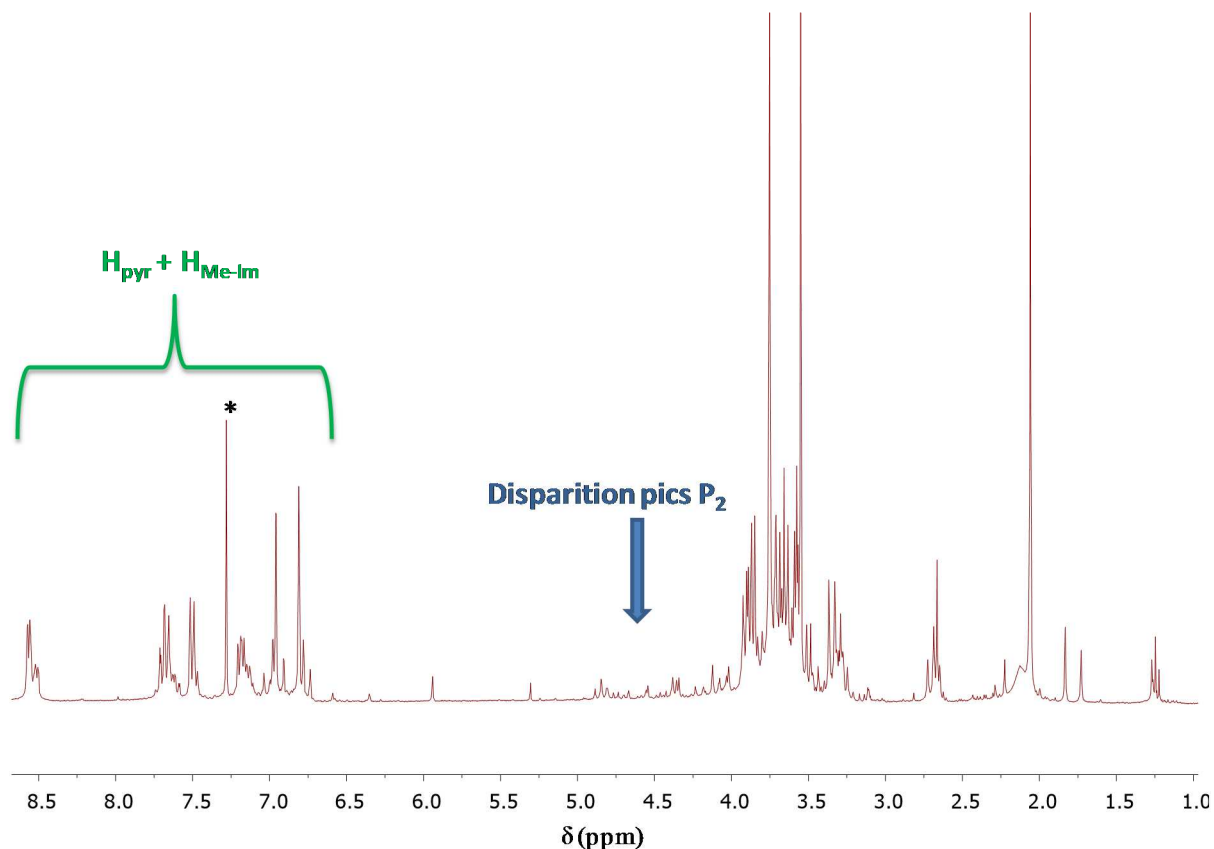


Figure 2. 13: Spectre RMN ^1H du ligand L^{26} (fraction purifiée) ($^*\text{CDCl}_3$, 300 MHz).

En effet, un grand pic majoritaire est observé pour le méthyl en R_1 vers 2 ppm et deux pics pour les esters méthyliques vers 3,5-3,7 ppm. Cette asymétrie est due soit à une forme *trans* du ligand, soit à un « blocage » des motifs méthyl-imidazoles en *cis* qui ne pointent pas dans la même direction. Cette dernière hypothèse semble en accord avec la RMN d'une autre fraction de la purification qui montre deux formes majoritaires du ligand. D'autre part, nous pouvons constater la disparition des pics correspondants au précurseur P_2 , ce qui est en accord avec la formation de la bispidone. Cependant, faute de pouvoir purifier correctement le produit brut, la voie de synthèse n'a pas été poursuivie dans le cas de ces substituants imidazoles.

c) Synthèse du ligand L^4

Le ligand L^4 a été synthétisé à partir de l'acide aminé glycine en vue d'obtenir directement la fonction acide carboxylique en R_2 . La synthèse a été effectuée dans conditions similaires à L^1 (Schéma 2. 9). Il en est de même pour la purification puisque ce ligand a été obtenu par cristallisation sous forme de cristaux blancs dans le méthanol.

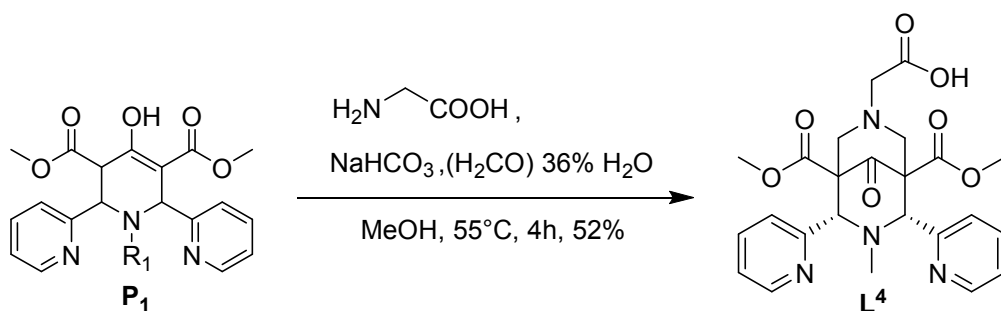


Schéma 2. 9: Synthèse du ligand L^4 .

Par cette synthèse, nous avons montré qu'il était possible d'introduire directement des acides aminés en R_2 . L'ajout de NaHCO_3 permet de déprotoner l'amine de la glycine ($\text{pK}_a \sim 9$) afin que cette dernière réagisse. Le ligand L^4 a été obtenu en conformation chaise-chaise avec les pyridines en *cis* (Figure 2. 14).

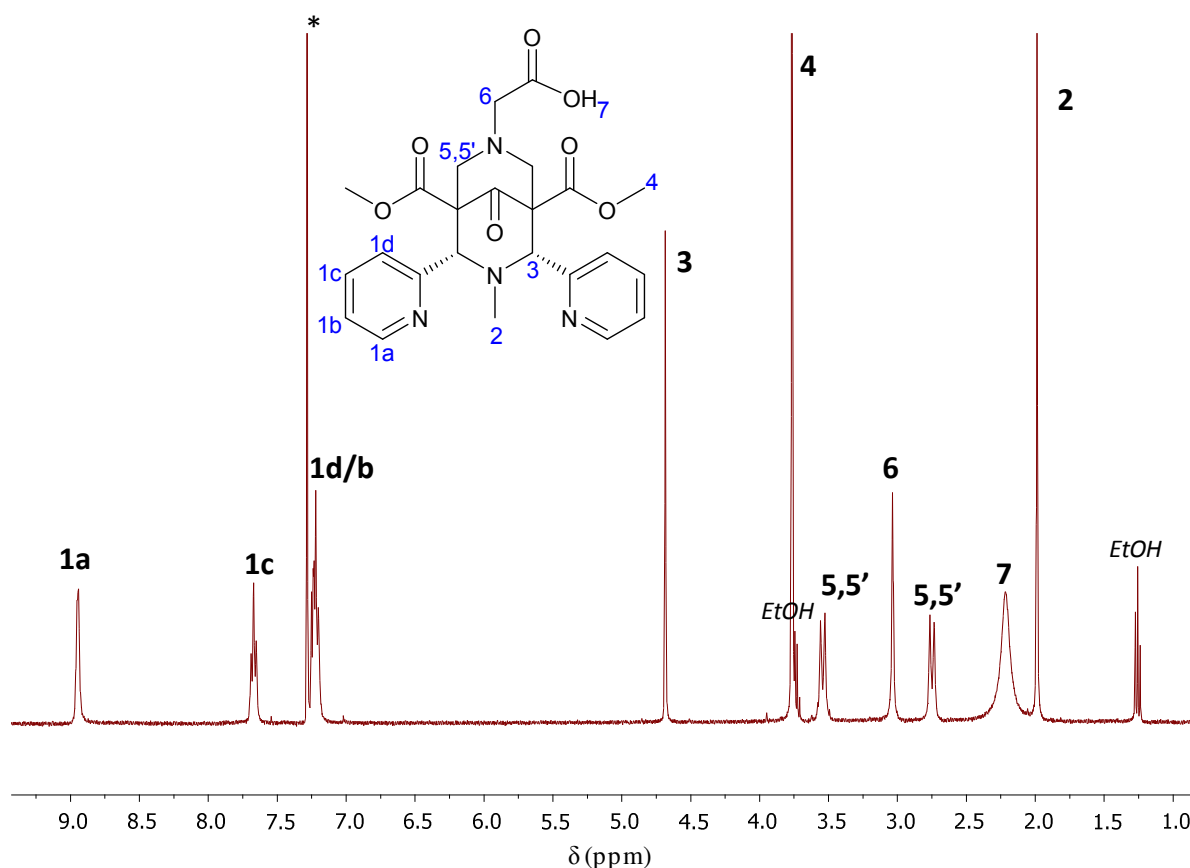


Figure 2. 14: Spectre RMN ^1H du ligand L^4 (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$).

Sachant que le précurseur de départ contenait une proportion de forme *cis* plus élevée que le rendement de cette réaction, nous pouvons une nouvelle fois penser qu'il n'y a pas isomérisation de la forme *trans* vers la forme *cis* lors de la synthèse du ligand.

Au vu de ce résultat, d'autres synthèses de bispidones avec différents acides aminés (histidine, sérine, thréonine) ont été tentées mais sans succès puisqu'il n'y a pas eu cristallisation des ligands attendus. En effet, ce type de composé n'est pas chromatographiable. Des essais de migration sur plaque CCM dans différentes conditions (SiO_2 80/20 DCM/MeOH et phase inverse 50/50 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) ont montré la présence de nombreux composés mal définis sur l'ensemble de la migration. Cela limite les possibilités de purification et donc d'obtention de nouvelles espèces. Seule la synthèse d'une bispidone avec le motif lysine comme acide aminé en R_2 a donné des résultats concluants (chap. IV).

d) Synthèse du ligand L^7

Un troisième ligand a été synthétisé selon la même voie, afin d'introduire un motif méthylthiophène en R_2 (Schéma 2. 10).

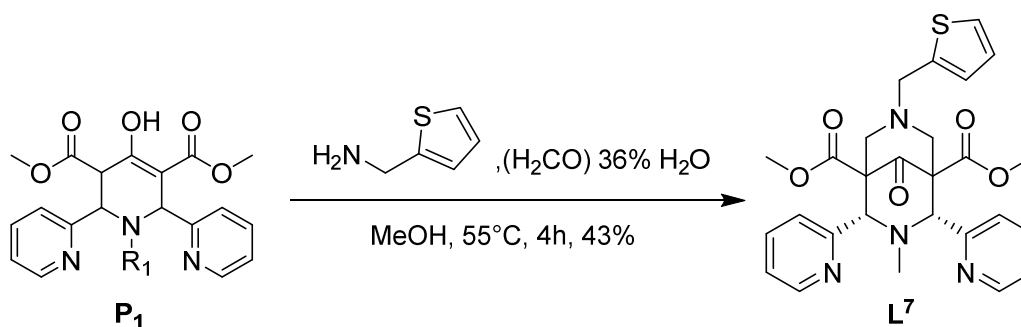


Schéma 2. 10: Synthèse du ligand L^7 .

Le spectre RMN ^1H du ligand L^7 montre bien une seule espèce bispidone dont les signaux sont fins et bien définis (Figure 2. 15). L'espèce obtenue est bien symétrique puisqu'aucun signal n'est dédoublé ce qui est en accord avec les motifs pyridines en *cis*. De plus, au vu des déplacements chimiques, le ligand possède une configuration chaise-chaise.

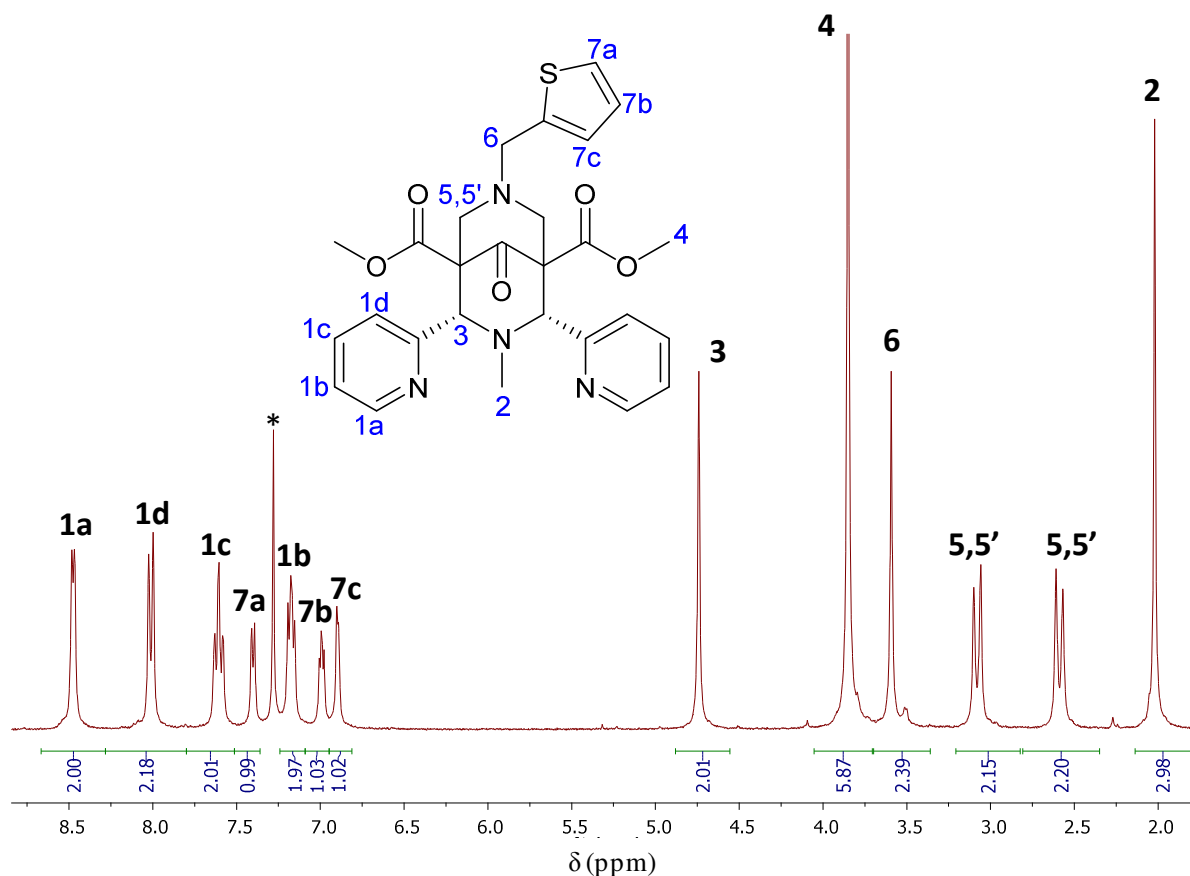


Figure 2. 15: Spectre RMN ^1H de la bispidone L^7 après recristallisation (300 MHz, $^*\text{CDCl}_3$).

Les spectres des ligands L^1 , L^4 et L^7 montrent comme signaux particuliers un système AB pour les protons H_5 avec MeOD ou CDCl_3 comme solvants deutérés ainsi que des doublets et triplets pour les protons H_{1a} à H_{1d} . Un autre point intéressant à étudier est l'ordre des signaux correspondants aux pyridines (H_{1a} à H_{1d}). En effet, dans le cas du ligand L^7 , on peut observer un motif doublet-doublet-triplet-triplet (DDTT) vers les champs forts. Ce même motif est également observé dans le cas de L^1 mais pas dans le cas de L^4 (DTDT). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le ligand L^4 possède une fonction acide carboxylique, capable de faire des liaisons hydrogènes alors que les deux autres ligands n'ont pas cette possibilité avec les fonctions ester éthylique ou encore thiophène.

De même que dans les précédentes synthèses, rien ne semble indiquer une isomérisation au cours de la formation du ligand car le pourcentage de forme *cis* du précurseur est toujours supérieur au rendement de ligand obtenu.

D'autre part, l'introduction du méthyl-thiophène nous permet d'obtenir une sphère de coordination différente de celles obtenues avec L^1 et L^4 , et donc de pouvoir comparer

l'influence de la coordination du cuivre(II) à une fonction soufrée, par rapport à une fonction carboxylate et à une fonction ester.

Pour conclure, les trois ligands finalement obtenus en conformation chaise-chaise avec les motifs pyridine en *cis*, sont donc de bons candidats pour la complexation du cuivre(II). Ils présentent une cavité de coordination adaptée au métal. Pour les autres ligands que nous n'avons pas réussi à isoler, il reste des optimisations à faire afin d'arriver à une voie de purification optimale.

4. Optimisation de la stabilité et de la solubilité des bispidones

a) Synthèse du ligand L³

i. Réduction du ligand L¹ (L²)

Le ligand L¹ obtenu, malgré la bonne conformation qu'il possède, n'est pas encore optimal pour les études physico-chimiques. En effet, en milieu très acide, la cétone centrale conduit dans la plupart des cas à un processus de dégradation de la molécule par ouverture de cycle selon un mécanisme de rétro-Mannich (Schéma 2. 3).

C'est pourquoi il est nécessaire de modifier cette fonction cétone. La voie que nous avons choisie consiste à la réduire en fonction alcool, ce qui empêchera le phénomène de dégradation par rétro-Mannich. Différentes voies de réduction ont déjà été décrites dans la littérature^{14,15,16,17} (Conditions : MeOH, NaBH₄ (10 éq.), 0°C, 12h ou dioxane/H₂O, NaBH₄ (7 éq.), 5°C, 4 jours). D'après les travaux du groupe de Holzgrabe,¹⁷ la réaction n'est pas diastéréofaciale et les deux isomères de configuration sont obtenus dans des proportions variables, quelque soit la méthode de synthèse. Cependant, dans les travaux de Comba,¹⁴ un seul isomère est isolé après la réduction en milieu dioxane/eau (rendement = 55%).

Des essais ont donc été effectués dans un mélange dioxane/eau sans être concluants. Pour le ligand L¹, nous avons testé l'autre voie de réduction dans le méthanol. Trois essais différents ont été effectués (avec quelques modifications des conditions de réaction) et trois produits différents ont été isolés après purification sur colonne (Schéma 2. 11).

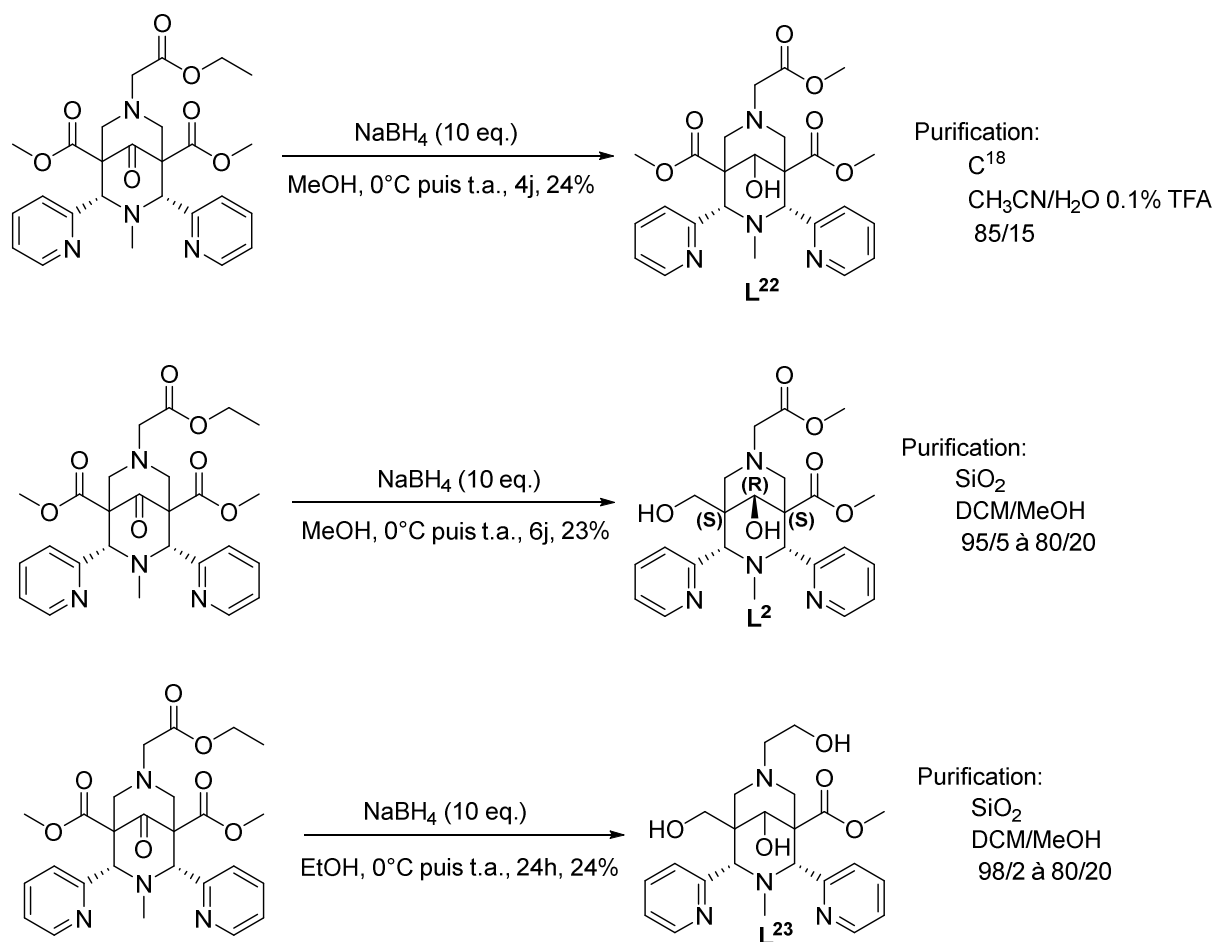


Schéma 2. 11: Voies de synthèse pour la réduction de la cétone centrale de L¹ (produits majoritaires isolés).

Dans un premier temps, on peut noter que la réduction n'est pas régiosélective puisque le ligand est réduit sur une, deux ou trois positions. Le solvant semble jouer un rôle sur le degré de réduction de la molécule. En effet, on constate que lorsqu'on se trouve dans l'éthanol par rapport au méthanol, le produit majoritaire obtenu comporte trois alcools au lieu d'un seul attendu. Un solvant plus apolaire pourrait favoriser la réduction des esters présents. Cependant, la méthode de purification est légèrement différente dans les deux cas et, au vu du rendement obtenu, il est possible que les deux produits soient formés dans les deux cas sans avoir pu être isolés. Ceci est d'autant plus possible que les purifications des ligands réduits se révèlent assez complexes (le chromatogramme ne présentant pas de pics fins mais plutôt plusieurs massifs).

Dans un second temps, on peut remarquer que le temps de réaction joue également sur l'espèce majoritaire obtenue. En effet, entre quatre et six jours de réaction à température ambiante, le ligand possèdera un alcool de plus à la place d'un ester. Dans le méthanol, on peut également noter un processus de transestérification au niveau de l'ester éthylique en R₂.

Ce travail sur l'optimisation de la réduction nous a permis d'obtenir le ligand L^2 qui a été utilisé pour la suite de la synthèse. Les deux autres ligands, quant à eux, ont été obtenus purs et caractérisés mais le ligand L^{23} ne possède plus l'ester à saponifier en R_2 , nécessaire à la complexation du cuivre(II) et le ligand L^{22} n'a pas été obtenu en quantité suffisante pour les étapes suivantes.

ii. Saponification du ligand L^2 (L^3)

Le ligand L^2 a ensuite été saponifié par NaOH afin d'obtenir deux acides carboxyliques sur la molécule et ainsi la rendre soluble en milieu aqueux (Schéma 2. 12).

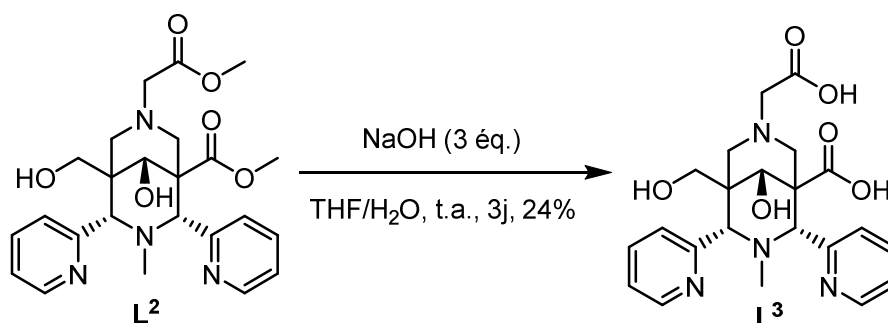


Schéma 2. 12: Saponification du ligand L^2 .

Le ligand ainsi obtenu a été purifié plusieurs fois sur colonne chromatographique et sa pureté a été déterminée par analyses élémentaires ($C_{22}H_{26}O_6N_4 \cdot 5NaCl \cdot 3H_2O$), RMN 1H et ^{13}C et infrarouge. Ce ligand nous a permis d'effectuer des études physico-chimiques : détermination des constantes de protonation et de complexation, cinétique de complexation et décomplexation, calcul du potentiel d'oxydo-réduction (chap. III).

b) Synthèse du ligand L^6

i. Réduction du ligand L^4 (L^5)

Tout comme le ligand L^1 , nous avons décidé de réduire le ligand L^4 mais cette fois-ci, en modifiant les conditions de réduction afin d'essayer d'améliorer le rendement mais également de ne réduire que la cétone centrale. Nous avons donc effectué la réaction avec seulement 1.5 équivalent de $NaBH_4$ au lieu de 10 équivalents et avec une température plus basse, diminuant ainsi le risque de réduire les esters méthyliques de la molécule (Schéma 2. 13).

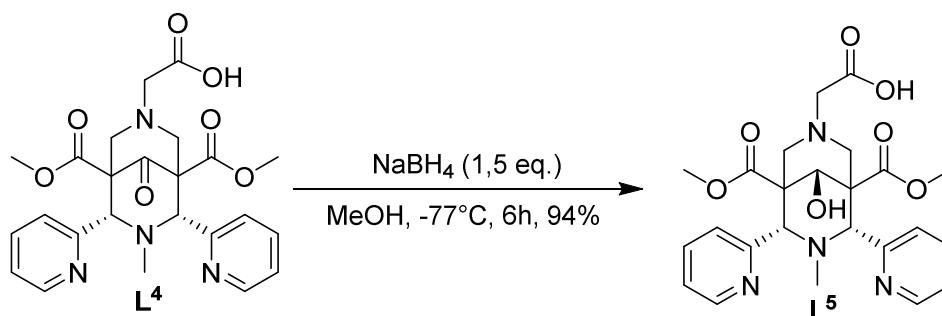


Schéma 2. 13: Réduction du ligand L^4 par 1.5 équivalent de NaBH_4 .

Le rendement obtenu est effectivement bien supérieur à celui de la réduction de L^1 . Les conditions utilisées dans ce cas-là permettent donc d'éviter la formation de produits secondaires.

ii. Saponification du ligand L^5

Une fois le ligand réduit obtenu, celui-ci est saponifié de la même manière que le ligand L^2 (Schéma 2. 14).

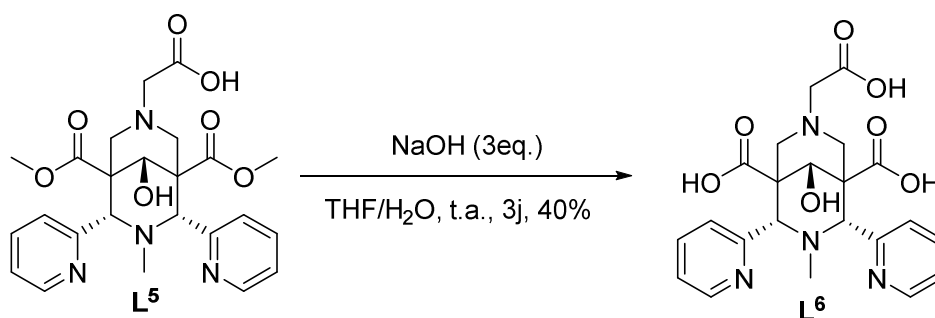


Schéma 2. 14: Saponification du ligand L^5 .

Cette synthèse nous a permis d'obtenir un ligand L^6 ($\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{N}_4\text{Na}_3 \cdot 2\text{NaCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) similaire à L^3 mais possédant une fonction acide carboxylique de plus. Celle-ci nous a surtout permis de mettre au point les conditions de synthèse au niveau de l'étape de réduction afin que la réaction soit plus sélective.

c) Synthèse du ligand L^9

i. Réduction du ligand L^7

Le ligand L^7 a d'abord été réduit selon les conditions initiales (comme le ligand L^1), puis avec seulement 1,5 équivalent de réducteur à -77°C (comme le ligand L^4) (Schéma 2. 15).

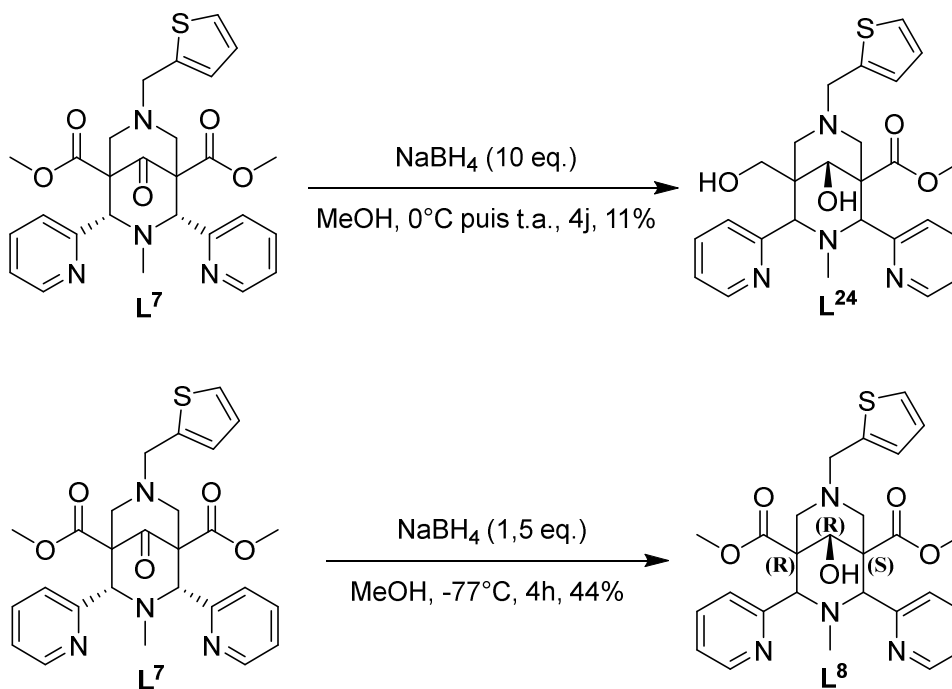


Schéma 2. 15: Réduction du ligand L^7 .

L'intérêt du changement des conditions de réaction est bien mis en évidence et nous permet d'obtenir l'espèce souhaitée avec les deux esters méthyliques qui seront saponifiés par la suite pour augmenter la solubilité en milieu aqueux, avec un bien meilleur rendement.

ii. Saponification du ligand L^8

La saponification se fait toujours par NaOH pour donner un ligand soluble dans le milieu aqueux (isolé sous forme $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{N}_4\text{S.HCl}$) (Schéma 2. 16).

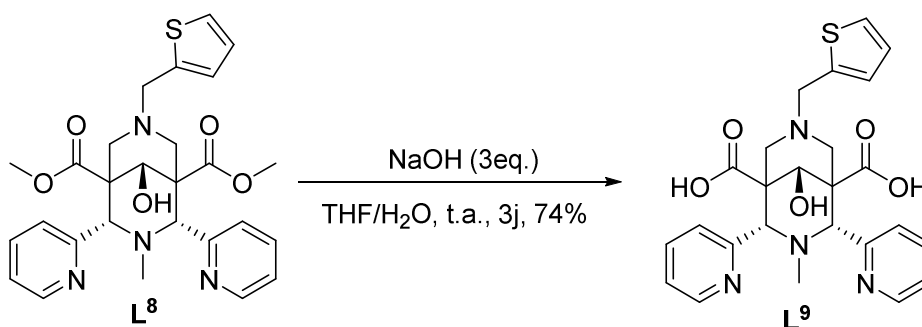


Schéma 2. 16: Saponification du ligand L^8 .

L'optimisation des ligands nous a permis d'obtenir trois ligands différents, stables en milieu acide et basique et solubles en milieu aqueux.

5. Caractérisation des ligands par RMN

La caractérisation des ligands a pu se faire grâce aux études RMN et notamment aux études 2D (COSY, HSQC, NOESY) qui ont permis de déterminer la conformation des ligands (Figure 2. 16).

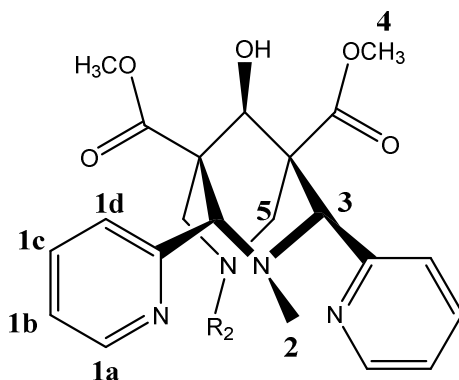


Figure 2. 16: Structure générale des bispidoles.

Lors de la synthèse des ligands réduits, des RMN ¹H ont été effectuées sur le produit brut afin de vérifier l'avancement de la réaction. Nous nous sommes alors rendu compte que la protonation du ligand avait beaucoup d'influence au niveau de la résolution du spectre. En effet, après plusieurs essais, nous avons remarqué qu'en ajoutant du TFA dans le milieu, les spectres étaient alors beaucoup mieux résolus (Figure 2. 17). La protonation totale de la molécule en milieu acide fait qu'on ne voit plus qu'une seule espèce protonée sur le spectre.

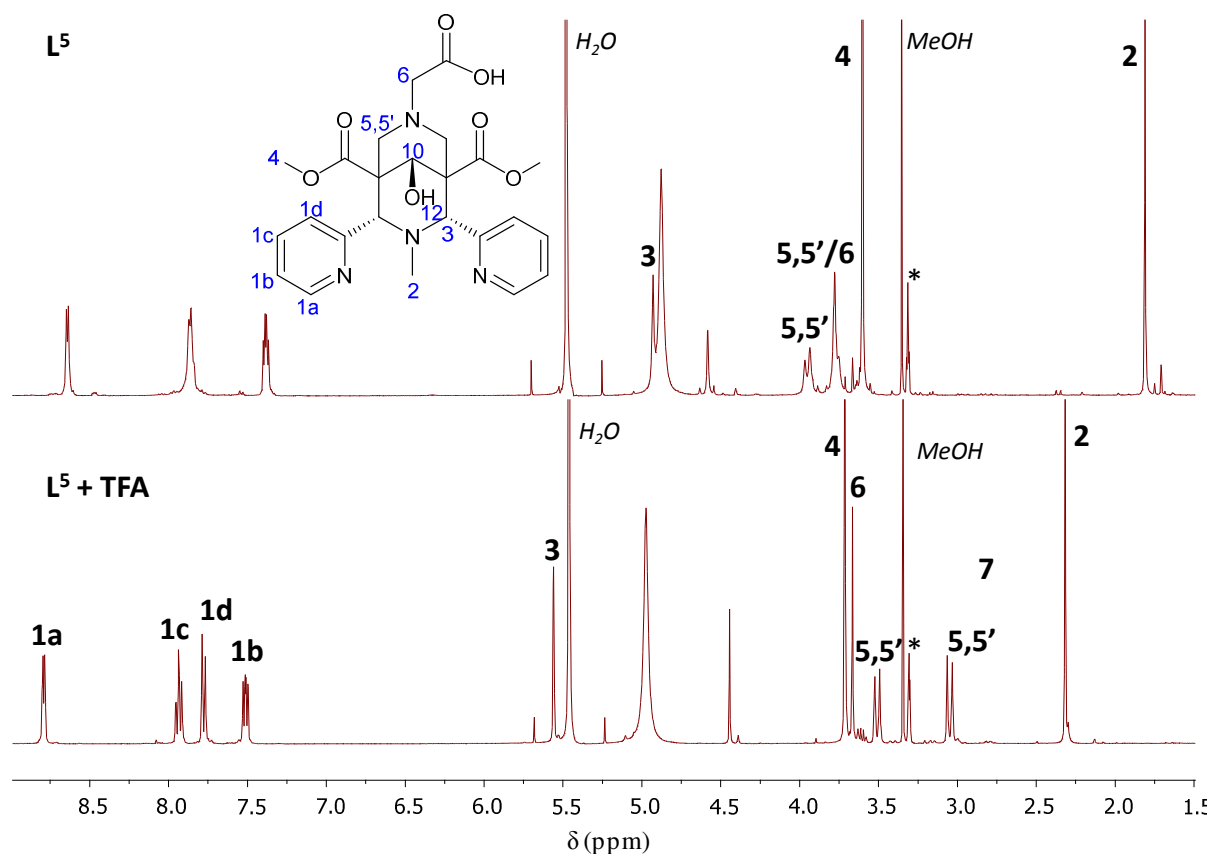
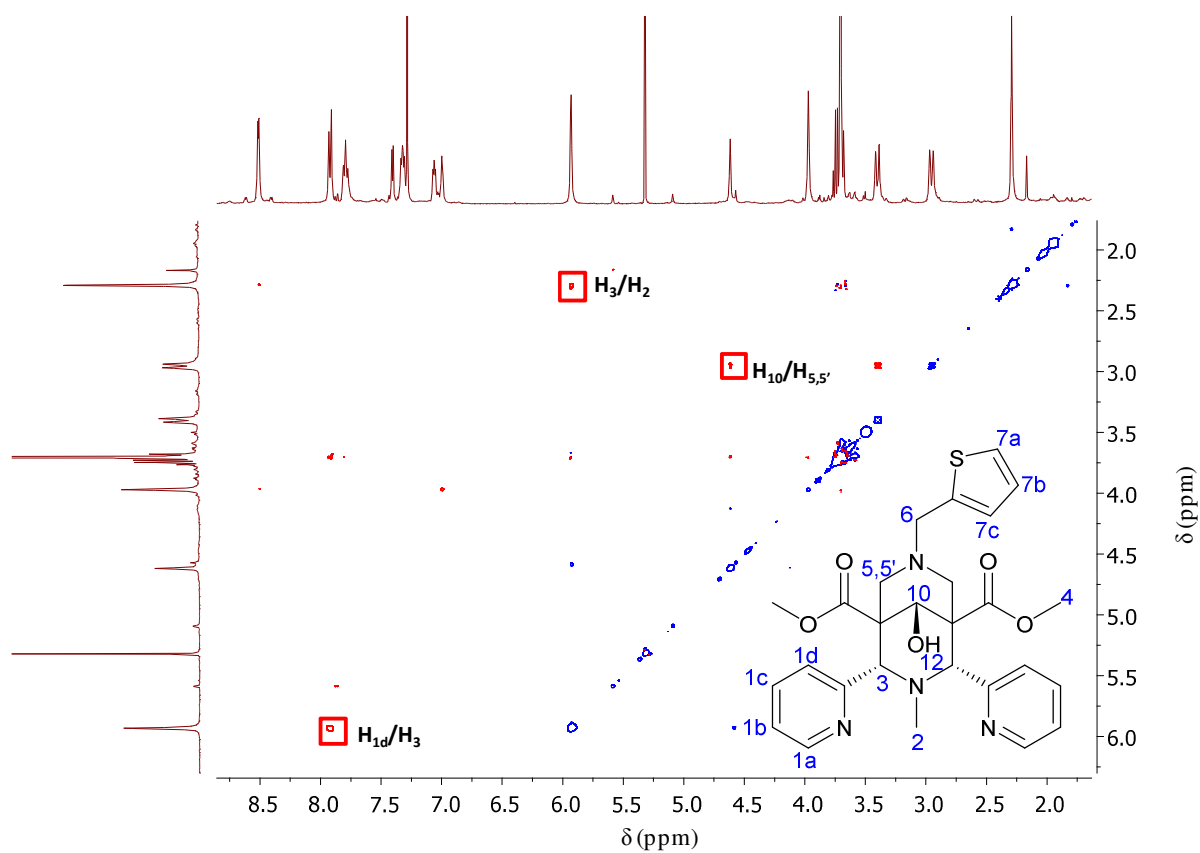
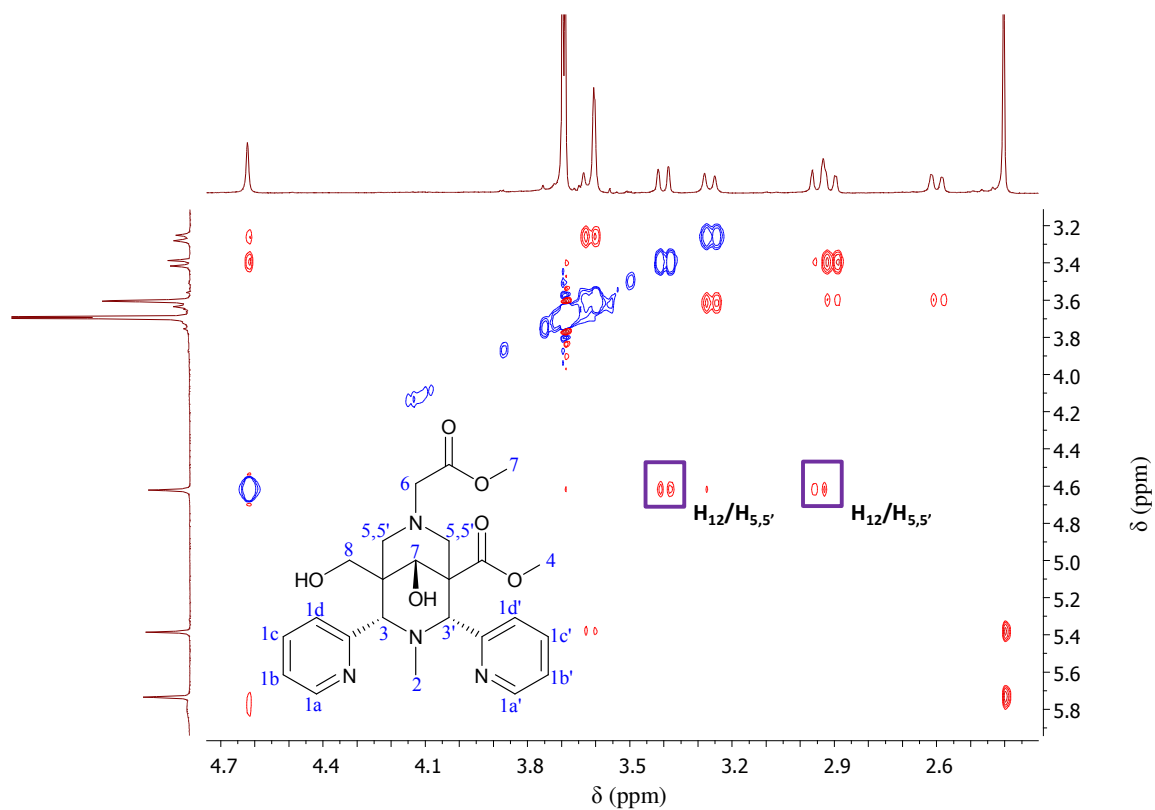


Figure 2. 17: Comparaison des spectres RMN ¹H du ligand L⁵ avec (bas) et sans TFA (haut) (400 MHz, *CD₃OD).

Durant ces essais de réduction, un seul isomère de configuration a été isolé : il y a donc une diastéréosélectivité faciale. Nous avons alors cherché à déterminer la configuration de l'alcool tertiaire, à savoir, si le -OH pointait vers le groupement R₁ ou le groupement R₂. Afin de déterminer cette configuration du groupement hydroxyle, nous avons déterminé quels couplages NOESY étaient visibles entre le nouveau proton H₁₀ et les protons H₃ ou H₅ (Figure 2. 18, Figure 2. 19).

Sur les trois ligands, le résultat est le même puisque le groupement hydroxyle pointe du côté du R₁ pour l'espèce obtenue majoritairement. De plus, nous n'avons jamais observé spécifiquement la formation de l'autre isomère en RMN mais plutôt la présence d'espèces secondaires plus réduites. Nous pouvons donc en conclure que lors de la réaction de réduction, l'attaque par le réducteur NaBH₄ se fait du côté du R₂. L'attaque serait donc favorisée de ce côté par l'attraction électrophile de l'ester/acide/thiophène en R₂ avec le Na du réducteur (Figure 2. 20).



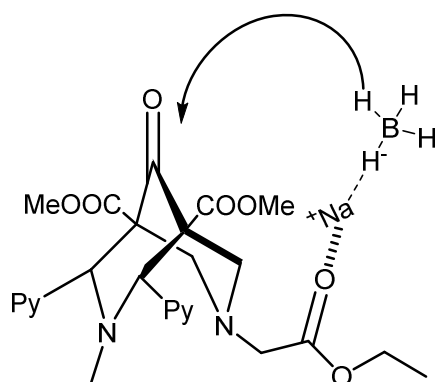


Figure 2. 20: Attaque du NaBH_4 sur la cétone du ligand L^1 .

Les études RMN 2D nous ont également permis de mettre en évidence un certain nombre de systèmes AB. En effet, dans le cas du ligand L^2 , nous avons pu observer trois systèmes AB différents (Figure 2. 21).

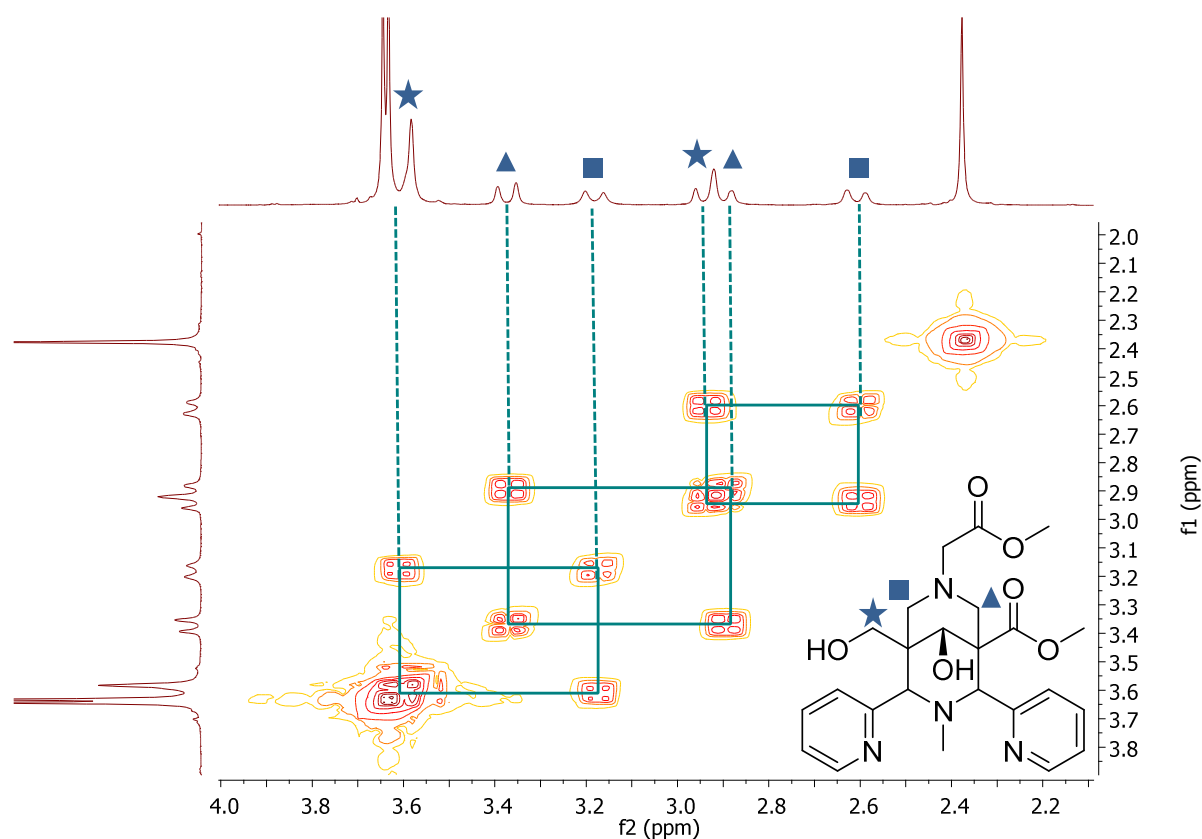


Figure 2. 21: Spectre COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ du ligand L^2 (400 MHz, CDCl_3).

En comparant tous les ligands réduits obtenus purs, on remarque que la constante de couplage des systèmes AB des protons H_5 reste du même ordre de grandeur dans tous les cas ($J_{\text{AB}} \sim 12$ Hz). On peut donc en conclure que les substituants du bicyclic n'ont que peu

d'influence sur ces protons une fois la molécule réduite. Après saponification du ligand L^2 pour donner le ligand L^3 , la RMN indique quatre systèmes AB différents (Figure 2. 22).

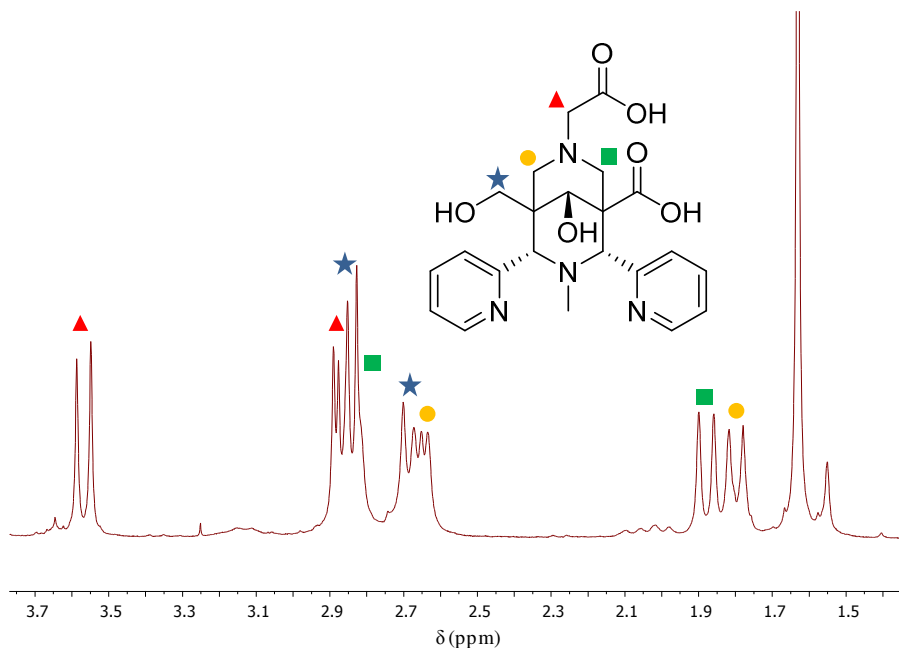


Figure 2. 22: Spectre 1H du ligand L^3 (300 MHz, D_2O).

Après la purification des composés saponifiés, les RMN 1H dans D_2O donnent, dans la plupart des cas, des signaux très larges et moyennés. Cela est dû à la présence de plusieurs formes protonées dans le milieu (pH neutre) en accord avec les études physico-chimiques (chap. III). Afin de pouvoir attribuer les différents signaux des protons, il est nécessaire de se placer en milieu basique afin de n'avoir qu'une seule espèce en solution (Figure 2. 23). Une deuxième solution consiste à ajouter du chlorure de zinc afin de vérifier qu'avec la complexation du métal, il y a bien une seule espèce présente (chap. III).

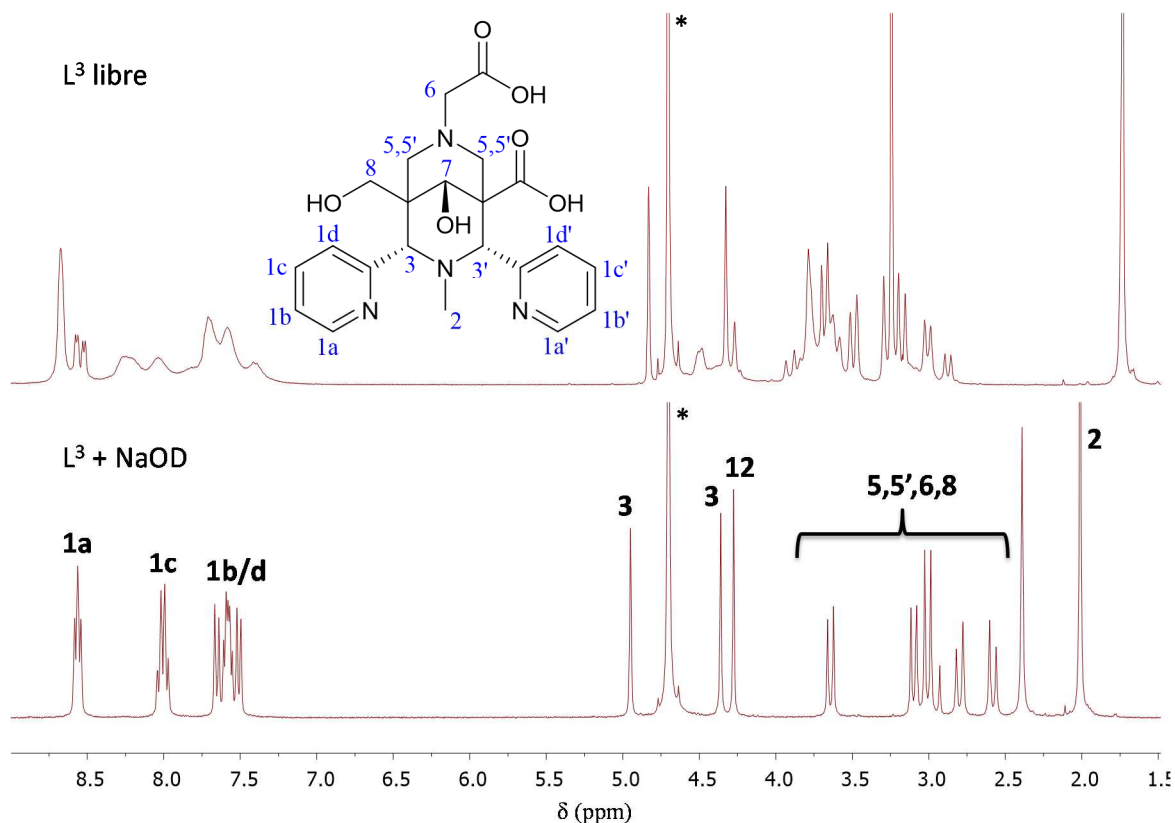


Figure 2. 23: Spectres RMN 1H du ligand libre L^3 sans (haut) et avec (bas) ajout de NaOD (300 MHz, $*D_2O$).

6. Conclusion

La synthèse des différents précurseurs nous a montré qu'il était difficile de modifier les substituants (notamment les pyridines) sans avoir de répercussion sur la réactivité lors de la synthèse du précurseur ou de la bispidone.

De nombreuses pistes ont été étudiées afin d'introduire de nouveaux substituants en position R_2 sur les ligands, notamment des acides aminés (Figure 2. 24).

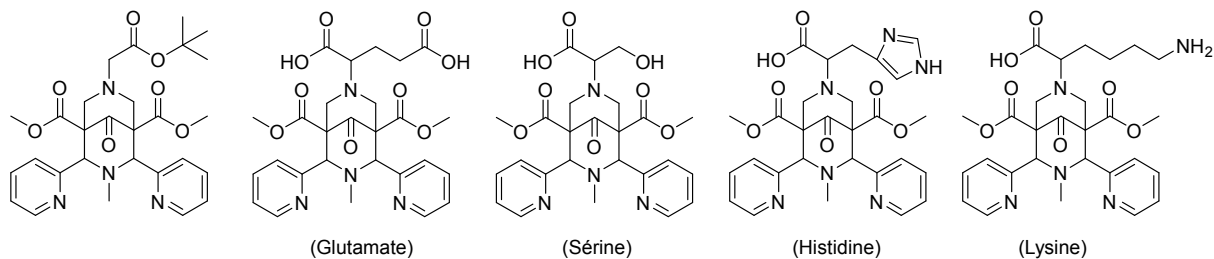


Figure 2. 24: Structure des autres bispidones envisagées.

Excepté pour la glycine et la lysine (dont la synthèse du ligand sera développée au chap. IV), aucune bispidone n'a pu être isolée par cristallisation ou précipitation. De plus, les spectres RMN des produits bruts étant très compliqués ainsi que la migration sur plaque CCM, il n'est

pour l'instant pas envisageable d'effectuer des purifications par colonnes chromatographiques. Cette contrainte au niveau de l'obtention des bispidones, nous a empêchés d'élargir cette famille de molécule.

Néanmoins trois ligands ont pu être obtenus pour poursuivre les études physico-chimiques (chap. III) et pour étudier la fonctionnalisation de ces bispidines (chap. IV) (Figure 2. 25).

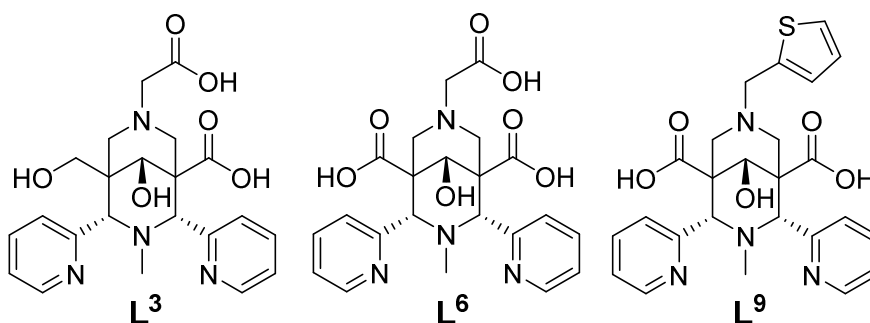


Figure 2. 25: Structures des ligands réduits et saponifiés obtenus L³, L⁶ et L⁹.

Au niveau des perspectives d'obtention de nouvelles bispidines, d'autres voies de synthèse sont envisageables. La principale voie actuellement développée au laboratoire est de synthétiser une bispidone bis-NH (Figure 2. 26).

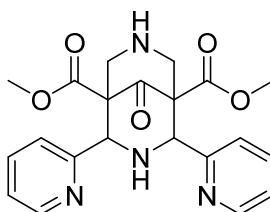


Figure 2. 26: Structure de la bispidone bis-NH.

Cette molécule peut être considérée comme une nouvelle plateforme qui pourrait accueillir différents substituants en position R₁ et R₂, via des réactions d'alkylation ou d'amination réductrice (chap. V).¹⁸

¹ Comba, P.; Morgen, M.; Wadepohl, H. Tuning of the Properties of Transition-Metal Bispidine Complexes by Variation of the Basicity of the Aromatic Donor Groups. *Inorg. chem.* **2013**, *52*, 6481–6501.

² Jeyaraman, R.; Avila, S. Chemistry of 3-azabicyclo[3.3.1]nonanes. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 149–174.

³ Knabe, J.; Ruppenthal, N. Synthesis of 3,4-dimethoxy-6-(γ -3,4-dimethoxyphenyl(propyl)benylalcoholphenylurethan by way of homolaudanosine. *Arch. Pharm.* **1964**, *297*, 141-146.

⁴ Comba, P.; Lopez de Laorden, C.; Pritzkow, H. Tuning the Properties of Copper (II) Complexes with Tetra- and Pentadentate Bispidine (= 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonane) Ligands. *Helv. chim. acta* **2005**, *88*, 647–664.

⁵ Diwischek, F.; Arnone, M.; Engels, B.; Holzgrabe, U. Studies on the Stereochemistry of 1, 2, 6-Trimethyl-4-Piperidone. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6993–7001.

⁶ Holzgrabe, U.; Erciyas, E. Synthese Und Stereochemie Potentiell Stark Analgetischer 2,4-M-Diarylsubstituierter 3,7-Diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-on-1,5-Diester. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1992**, *325*, 657–663.

⁷ Siener, T.; Holzgrabe, U.; Drosihn, S.; Brandt, W. Conformational and Configurational Behaviour of K-Agonistic 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonan-9-Ones—synthesis, Nuclear Magnetic Resonance Studies and Semiempirical PM3 Calculations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 1827–1834.

⁸ LaRonde, F. J.; Brook, M. A. Stereoselective Reduction of Ketones Using Extracoordinate Silicon: C2-Symmetric Ligands. *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *296*, 208–221.

⁹ Howson, S. E.; Allan, L. E. N.; Chmel, N. P.; Clarkson, G. J.; Deeth, R. J.; Faulkner, A. D.; Simpson, D. H.; Scott, P. Origins of Stereoselectivity in Optically Pure Phenylethaniminopyridine Tris-Chelates M(NN')₃n⁺ (M = Mn, Fe, Co, Ni and Zn). *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 10416.

¹⁰ Pauling, L. The Nature Of The Chemical Bond. Iv. The Energy Of Single Bonds And The Relative Electronegativity Of Atoms. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 3570–3582.

¹¹ Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonniere, L. J. Substitution-Assisted Stereochemical Control of Bispidine-Based Ligands. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 11167–11176.

¹² Comba, P.; Kuwata, S.; Linti, G.; Tarnai, M.; Wadepohl, H. Synthesis and Oxidation of Vanadyl Complexes Containing Bispidine Ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 657–664.

- ¹³ Kuhl, U.; von Korff, M.; Baumann, K.; Burschka, C.; Holzgrabe, U. Stereochemical Behaviour of K-Agonistic 2, 4-Dipyridin-2-Yl-3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonanones— influence of the Substituent in Position N 3. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **2001**, 2037–2042.
- ¹⁴ Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. Hexadentate Bispidine Derivatives as Versatile Bifunctional Chelate Agents for Copper (II) Radioisotopes. *Bioconjugate chem.* **2009**, *20*, 347–359.
- ¹⁵ Bleiholder, C.; Börzel, H.; Comba, P.; Ferrari, R.; Heydt, M.; Kerscher, M.; Kuwata, S.; Laurency, G.; Lawrance, G. A.; Lienke, A.; et al. Coordination Chemistry of a New Rigid, Hexadentate Bispidine-Based Bis (amine) Tetrakis (pyridine) Ligand. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8145–8155.
- ¹⁶ Comba, P.; Kanellakopulos, B.; Katsichtis, C.; Lienke, A.; Pritzkow, H.; Rominger, F. Synthesis and Characterisation of Manganese (II) Compounds with Tetradentate Ligands Based on the Bispidine Backbone. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 3997–4002.
- ¹⁷ Samhammer, A.; Holzgrabe, U.; Haller, R. Reduktionen an 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonan-9-Onen Und 1, 3-Diazaadamantan-6-onen1). *Arch. Pharm.* **1989**, *322*, 545–550.
- ¹⁸ Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849–3862.

**Chapitre III : Etudes
structurales et physico-
chimiques**

1. Etudes structurales des complexes de zinc(II)

a) Synthèse et caractérisation des complexes

Des études sur la complexation du zinc(II) par les ligands L^1 - L^9 ont été réalisées, le zinc(II) étant utilisé comme analogue diamagnétique du cuivre(II).

Le ligand L^1 a été complexé par le $ZnCl_2$ en milieu THF/ H_2O , la complexation est très rapide (< 5 minutes) (Schéma 3. 1).

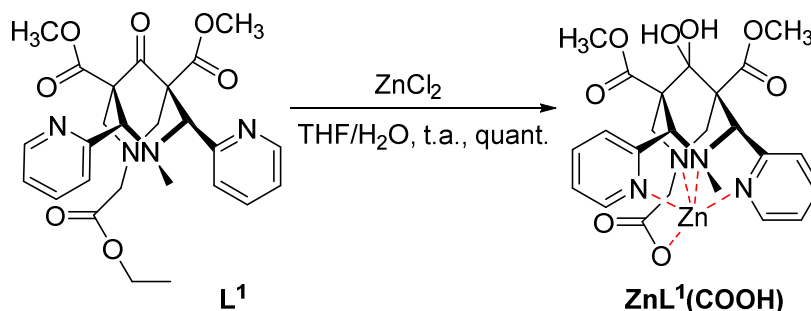


Schéma 3. 1: Formation du complexe ZnL^1 .

Les essais de complexation, effectués avec 1,1 équivalent de $ZnCl_2$, montrent des variations significatives au niveau des signaux en RMN 1H (Figure 3. 1).

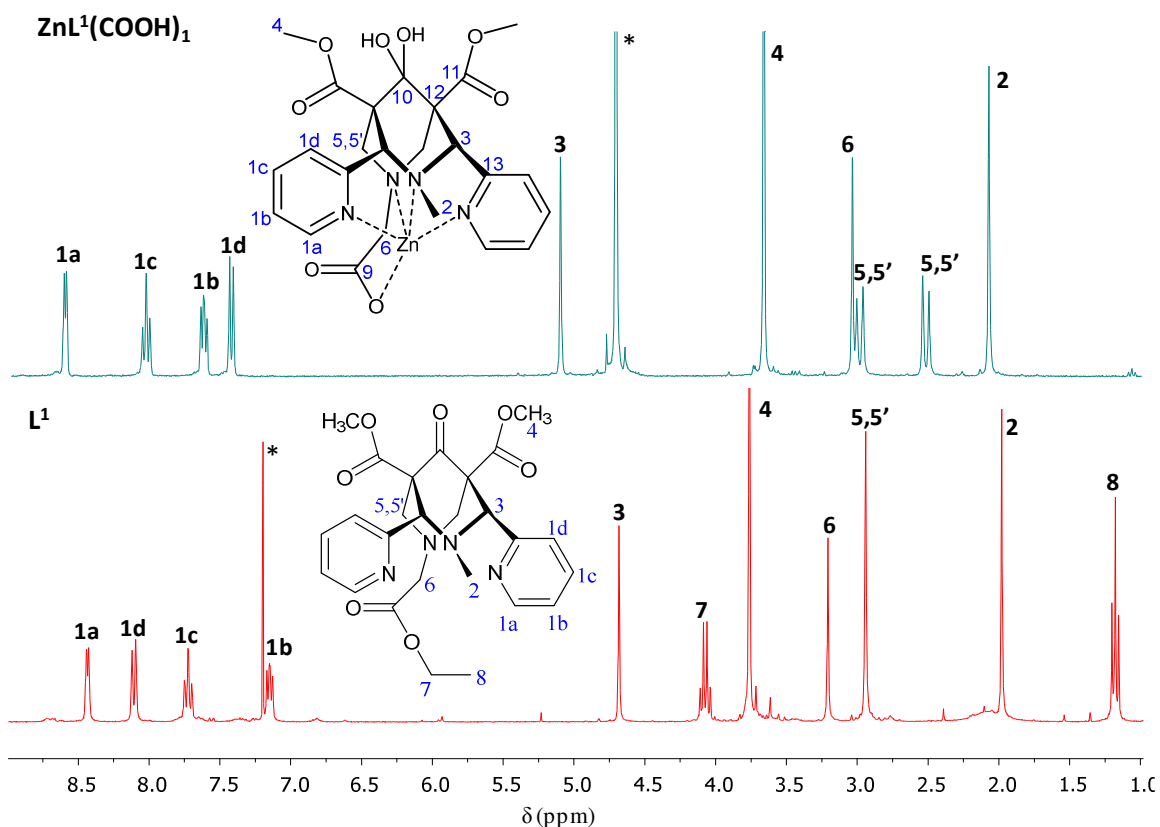


Figure 3. 1: Spectres RMN 1H du ligand L^1 seul (*CDCl_3 , bas) et en présence d'un équivalent de $ZnCl_2$ (*D_2O , haut) (200 MHz).

Les protons pyridiniques ont pu être attribués grâce aux spectres RMN COSY et NOESY (Figure 3. 2). Un couplage J^4 est observé entre les protons H_{1d} et H_3 , ce qui permet d'attribuer ensuite les autres protons H_{py} . Lorsque l'on passe du ligand au complexe, nous pouvons constater le déplacement du proton H_{1d} , qui se trouve plus blindé dans le cas du complexe à cause de la rotation des motifs pyridines qui passent de la conformation anti vers syn. Les protons H_{1d} se retrouvent alors dans le cône d'anisotropie des oxygènes des esters méthyliques. Un fort déblindage des protons H_3 est également observé, dû à la coordination de l'azote tertiaire voisin avec le métal. De plus, le signal correspondant aux protons $H_{5,5'}$ est totalement différent puisqu'un système AB est observé dans le cas du complexe. Ceci traduit une rigidification du système lors de la complexation ($\delta_A = 3,07$ ppm, $\delta_B = 2,60$ ppm, $J_{AB} = 13,1$ Hz).

D'autre part, le spectre RMN NOESY indique également les couplages suivants : H_4/H_{1d} et H_2/H_3 (Figure 3. 2). La proximité spatiale des protons H_{1d} de la pyridine et des protons des esters méthyliques confirme la conformation syn des pyridines avec les atomes d'azote qui pointent vers l'intérieur de la cavité, du fait de leur coordination au Zn^{II} . Ce changement de configuration est également mis en évidence par la RMN 1H sur laquelle on observe une modification au niveau du motif des pyridines, qui passe du motif DDTT (doublet-doublet-triplet-triplet) pour le ligand libre à DTTD pour le complexe de zinc (chap. II).

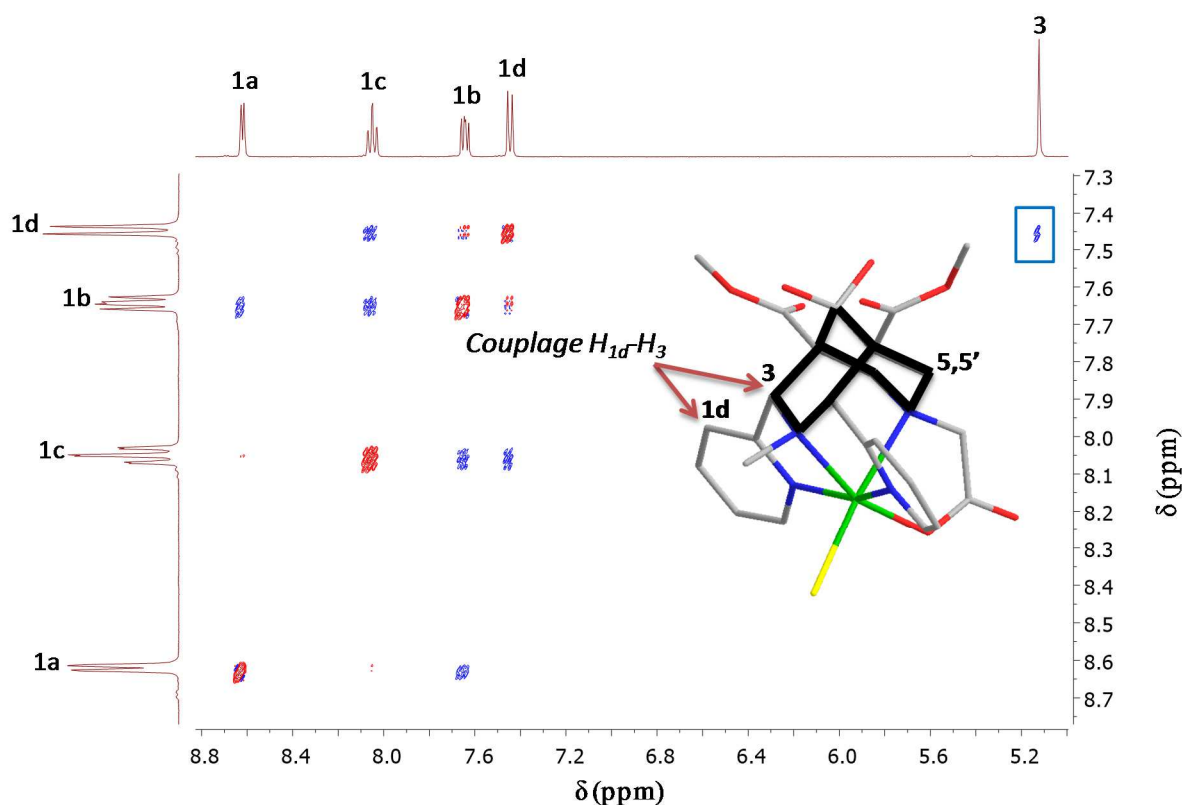
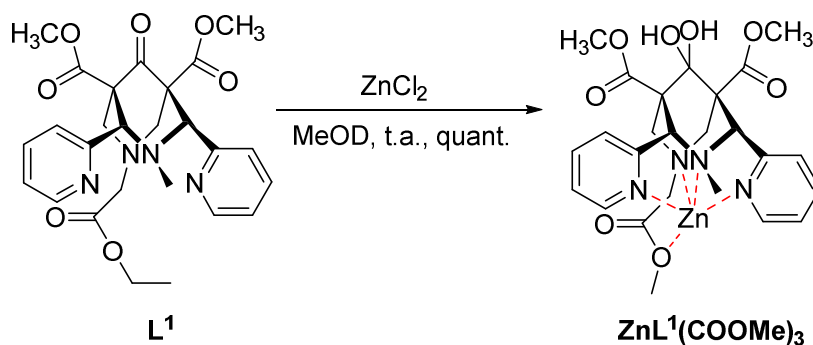
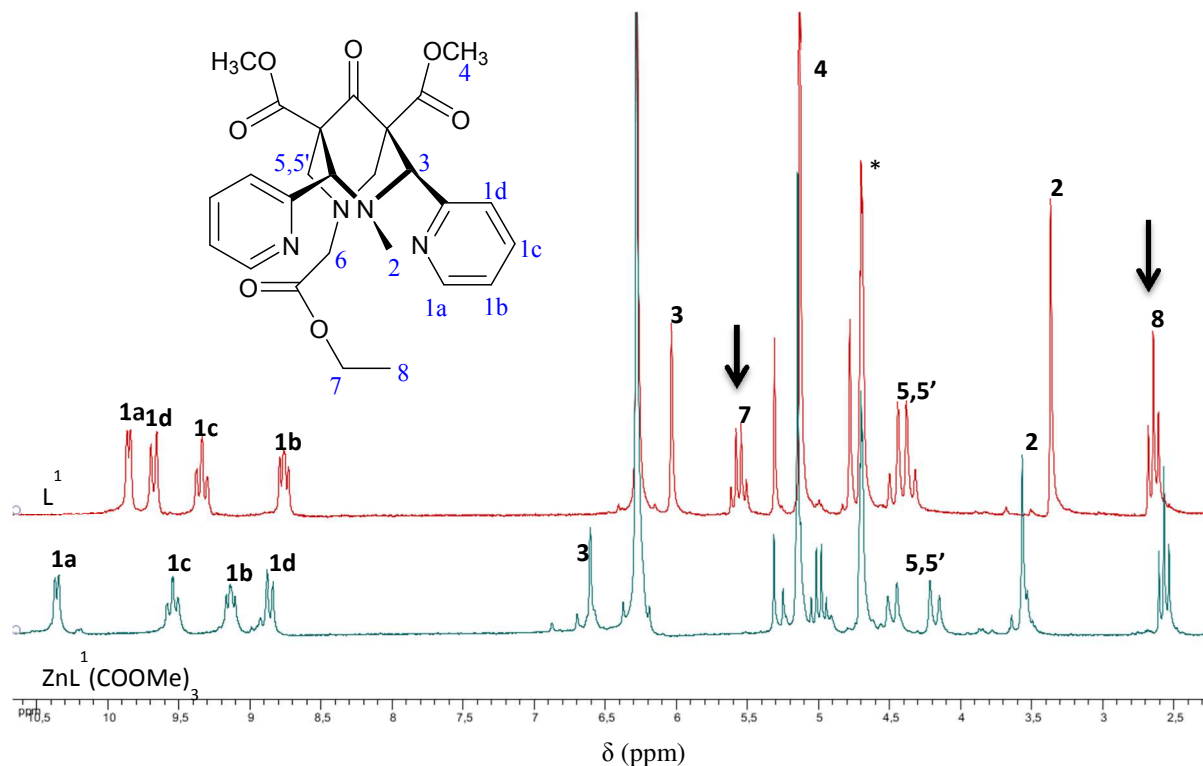


Figure 3. 2: Spectre RMN 2D NOESY du complexe $ZnL_1(COOH)$ (400 MHz, D_2O).

Il n'est pas observé d'effet Overhauser (NOE) entre H_3 et $H_{5,5'}$, ce qui indique vraisemblablement que les protons H_3 sont en position axiale et que la configuration *cis*-double-chaîne de la molécule est conservée. Cependant la complexation avec le zinc(II) induit un changement de conformation des pyridines d'anti (pour L^1) vers syn. De plus, le spectre carbone du composé indique que la cétone centrale (C_{10}) se trouve sous forme hydratée une fois le complexe formé ($\delta = 93$ ppm au lieu de $\delta = 203$ ppm).¹ Pour conclure, le zinc(II) est bien complexé par le ligand.

Cependant, lors de cette étude de complexation, un point intéressant a été remarqué. En effet, nous pouvons constater, sur le spectre du complexe, la disparition des signaux H_7 et H_8 correspondant à l'ester éthylique en position R_2 . Lors des premiers essais de complexation, ceux-ci avaient été effectués en milieu méthanol (deutéié) (Schéma 3. 2) et les RMN 1H indiquaient également une disparition des signaux H_7 et H_8 (Figure 3. 3).

Schéma 3. 2: Formation in situ du complexe $ZnL^1(COOMe)_3$.Figure 3. 3: Spectres RMN 1H du ligand libre L^1 (haut) et du complexe $ZnL^1(COOMe)_3$ (bas) (* CD_3OD , 200 MHz).

Ce résultat pouvait être attribué soit à une transestérification de l'ester éthylique en ester méthylique deutéré, soit à une hydrolyse de ce dernier (réaction totale au bout de 2h).

D'autres études ont donc été menées afin de conclure sur le mécanisme proposé. Des essais dans le DMSO ont été effectués mais ce solvant étant polaire mais aprotique, la complexation et l'hydrolyse de l'ester observées se sont révélées très lentes (62% d'hydrolyse au bout de trois jours). Le DMSO pourrait en effet jouer le rôle de compétiteur et ainsi défavoriser la complexation rapide du zinc(II) avec le ligand bispidine.

Un autre essai a donc été réalisé dans un solvant moins polaire, le THF. Le suivi RMN a démontré que la complexation s'effectuait bien mais qu'il n'y avait pas d'hydrolyse de l'ester

(ni transestérification, due à l'absence d'une fonction alcool). La solubilisation du complexe dans D₂O a ensuite permis cette hydrolyse (Figure 3. 1). C'est donc un processus en deux étapes qui s'effectue : tout d'abord la complexation du métal, puis l'hydrolyse de l'ester en milieu aqueux. Cette hydrolyse est donc catalysée par le zinc(II) et favorisée par l'augmentation de la stabilité du complexe.²

Cette étude sur les complexes de zinc(II) de L¹ nous a montré que nous pouvions obtenir une molécule comportant un acide carboxylique en R₂ après l'hydrolyse sélective par le métal. L'idée était alors de démétaller le complexe ZnL¹(COOH) afin d'arriver à une molécule sur laquelle nous aurions pu insérer un espaceur grâce à un couplage peptidique. Cependant, le complexe obtenu est extrêmement stable et malgré plusieurs tentatives, nous ne sommes pas parvenus à faire sortir le zinc(II) de la sphère de coordination.

Nous avons alors cherché à tester l'influence de la complexation d'autres cations avec notre ligand, afin de voir s'il était possible d'obtenir cette hydrolyse sélective tout en ayant la possibilité de décomplexer par la suite le cation utilisé.

Un autre cation a alors été testé, le calcium, mais seul un processus de transestérification a été observé lors des essais de complexation dans le méthanol. D'autres tests ont alors été effectués dans les solvants DMSO et THF/H₂O, sans résultat, puisqu'il n'y a eu ni hydrolyse de l'ester, ni complexation du calcium par le ligand. D'autres cations ont été utilisés (NaCl, LiOH, LiNO₃, MgCl₂, LuCl₃ et NaOH) mais aucun n'a donné le processus d'hydrolyse sélective attendu.

Cependant, les espèces NaOH et LiOH ont montré une hydrolyse totale de l'ester éthylique et partielle des esters méthyliques en milieu THF/H₂O, ainsi qu'une certaine dégradation du ligand au cours du temps. Ceci s'explique par l'instabilité des ligands bispidones en milieu très basique et très acide (chap. II) et donc la nécessité de la réduction de la cétone centrale en alcool.

En conclusion, de tous les cations testés, seul le zinc(II) permet d'aboutir à une molécule bien définie sur laquelle nous avons pu effectuer différentes caractérisations.

Dans le cas de la complexation des ligands L² et L³, les signaux obtenus indiquent bien une dissymétrie de l'espèce obtenue (Figure 3. 4).

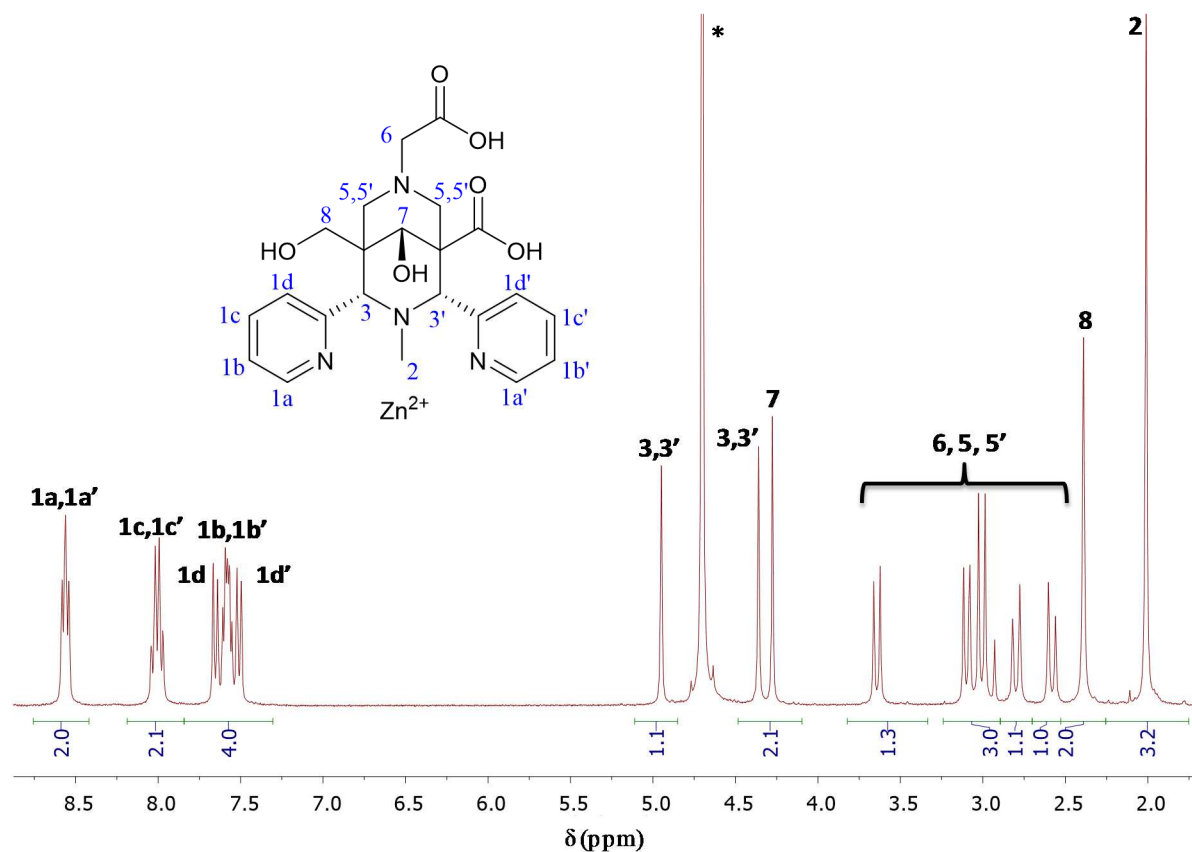


Figure 3. 4: Spectre RMN ^1H du ligand L^3 en présence d'un équivalent de ZnCl_2 (* D_2O , 300 MHz).

Les changements dans le spectre par rapport au ligand libre sont bien visibles (chap. II). Les signaux sont plus fins et mieux définis. Une seule espèce est clairement observée au vu du signal des protons H_2 qui donne un fin singulet. De plus, trois systèmes AB pour les protons H_6 et $\text{H}_{5,5'}$ avec des constantes de couplage variables (de 17,5 à 11,4 Hz) sont présents. Les études physico-chimiques du ligand L^3 libre et de ses complexes seront développées ultérieurement dans cette partie.

Pour les ligands L^1 et $\text{L}^4\text{-L}^9$, les ligands libres étant des molécules symétriques, les RMN ^1H des complexes de zinc(II) indiquent une seule famille de signaux (Figure 3. 5).

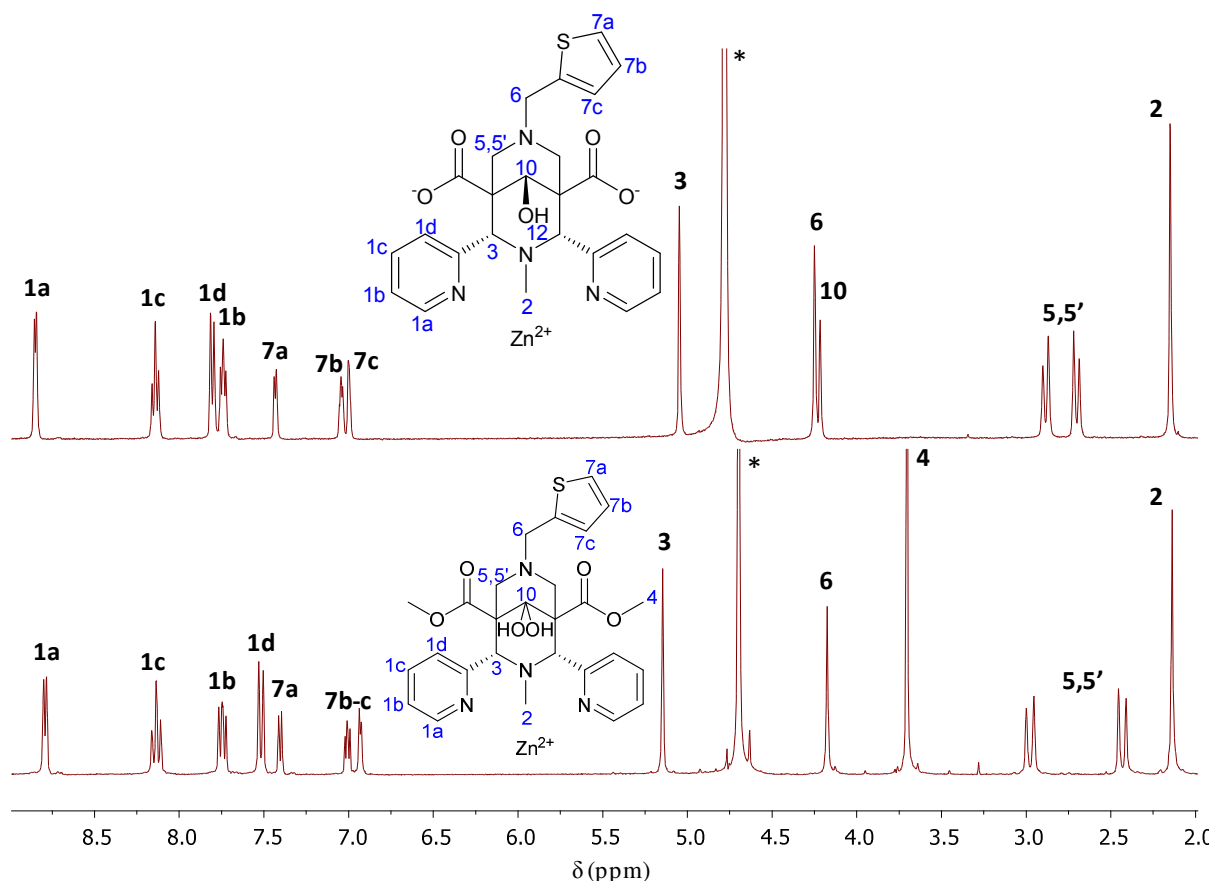


Figure 3. 5: Spectres RMN ^1H des complexes ZnL^7 (bas) et ZnL^9 (haut) préparés *in situ* ($^*\text{D}_2\text{O}$, 300 et 400 MHz).

Si l'on compare les deux complexes ZnL^7 et ZnL^9 , nous pouvons constater que les déplacements chimiques présentent quelques différences, notamment au niveau de la disparition du pic des protons H_4 due à la saponification des esters et l'apparition du proton H_{10} due à la réduction de la cétone centrale. Il y a également une modification au niveau du système AB des protons $\text{H}_{5,5'}$. Les protons H_{1d} sont aussi plus blindés, certainement à cause de la présence des carboxylates qui peuvent induire des liaisons hydrogènes. Cependant, ces variations au niveau des signaux sont assez limitées et nous montrent à quel point la sphère de complexation est rigide et donc, peu influencée par les modifications effectuées sur le squelette bispidone (chap. I).

b) Structure cristallographique

D'autre part, une structure cristallographique du complexe $\text{ZnL}^1(\text{COOH})$ a pu être obtenue en collaboration avec l'ISC de Rennes (Dr Franck Camerel) (Figure 3. 6).

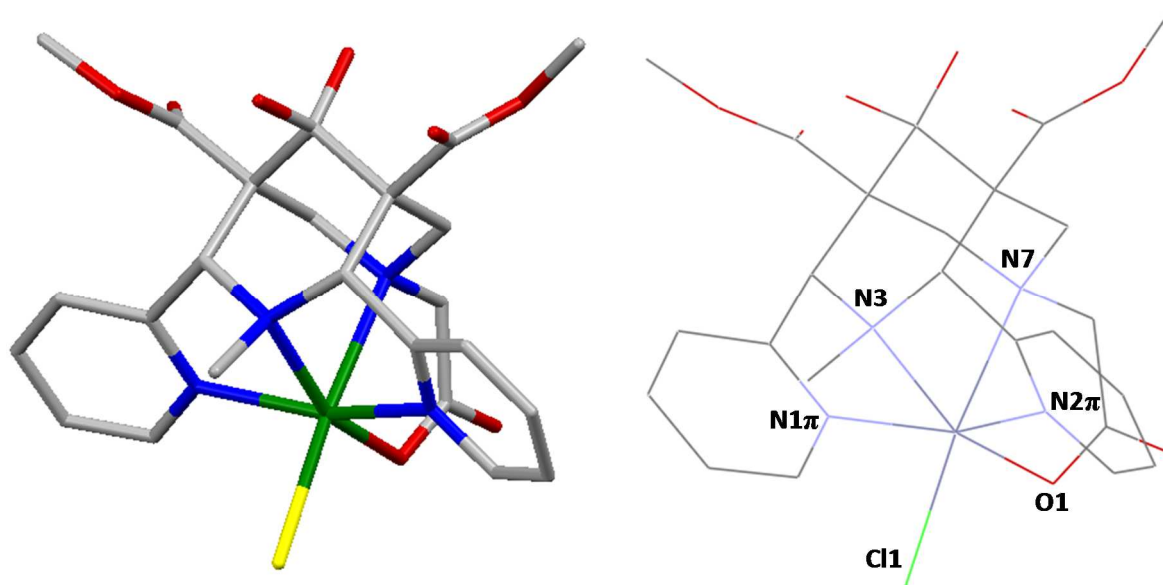


Figure 3. 6: Structure cristallographique du complexe $ZnL^1(COOH)Cl$.

Le complexe $ZnL^1(COOH)$ cristallise dans le groupe d'espace centro-symétrique $P21/c$. Le zinc(II) est hexacoordiné par les 2 azotes tertiaires N3 et N7, les azotes des pyridines N1 π et N2 π , le carboxylate (O1) et un ion chlorure (Cl1) dans une géométrie pseudo-octaédrique où l'azote N7 est en position axiale. D'autre part, la cétone se trouve sous une forme hydratée (diol), déjà remarquée sur la RMN ^{13}C . Des distances et angles particuliers ont été comparés à des structures de complexes bispidines déjà décrits dans la littérature (Figure 3. 7, Tableau 3. 1).

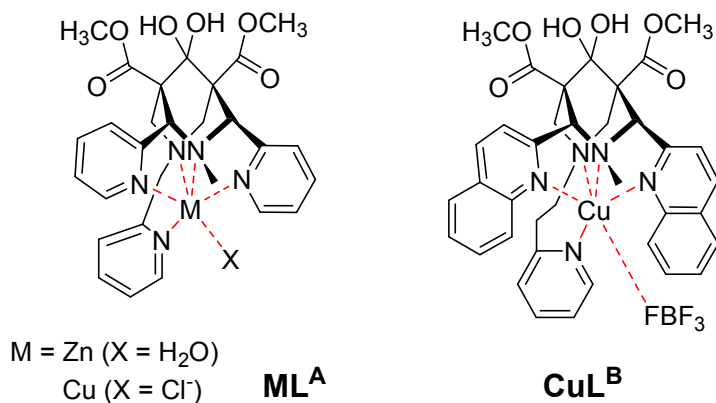


Figure 3. 7: Structures des complexes décrits dans la littérature ML^A ³ et CuL^B ⁴.

Complexes	ZnL ¹ (COOH)	ZnL ^A	CuL ^A	CuL ^B
Distances (Å)				
N3...N7	2,923	2,93	2,915	2,876
M...N7	2,349	2,186	2,036	2,000
M...N3	2,181	2,295	2,368	2,169
M...N1 π	2,135	2,113	2,028	2,235
M...N2 π	2,159	2,173	2,029	2,263
M...O1 ou N _{ar}	2,026	2,074	2,029	1,984
Angles de valence (°)				
N1 π ...M...N2 π	155,3	153,2	160,07	153,84

Tableau 3. 1: Données structurales expérimentales des complexes ZnL¹, ZnL^A 3, CuL^A 3 et CuL^B 4.

D'après ces valeurs, on peut constater que la distance N3-N7 est quasi-constante sur toute la série de complexes ce qui est caractéristique d'un cycle bispidine en configuration *cis*. De plus la distance N3-N7 est proche de celle du ligand (2,88 Å). Cela traduit à la fois une faible influence du rayon ionique ($r_i(\text{Zn}^{\text{II}}) = 68 \text{ pm}$ et $r_i(\text{Cu}^{\text{II}}) = 65 \text{ pm}$, pour CN= 5)⁵ et une faible influence de la complexation par rapport au ligand libre. Ceci est dû à la rigidité et la préorganisation naturelle du squelette bispidone de départ. Les distances M-N1 π et M-N2 π sont faiblement influencées par le changement de structure du ligand et le remplacement de la pyridine en R₂ par un groupement acétate se traduit essentiellement par une diminution de la distance M-N7 (Cu et Zn), ce qui laisse supposer une coordination plus forte avec le groupement carboxylate en R₂ par rapport au groupement pyridine. De plus, la somme des distances M-donneur, qui est une bonne indication de la contribution électrostatique à la stabilité du complexe, est similaire pour les 4 systèmes (de 10,49 à 10,85 Å).⁶

Nous pouvons donc conclure que la sphère de coordination obtenue avec ce ligand L¹ est similaire à celles obtenues par P. Comba.^{3,4} Ceci nous a encouragés à poursuivre les études sur la stabilité de nos composés en solution aqueuse.

2. Etudes physicochimiques

a) Propriétés acido-basiques des ligands L³ et L⁹

Les ligands réduits et saponifiés L³ et L⁹ étant stables dans une large gamme de pH, leurs propriétés physico-chimiques ont pu être étudiées par potentiométrie et spectrophotométrie

UV-visible. En effet, il est primordial de connaître la valeur des constantes de protonation afin de déterminer par la suite, les constantes de complexation du ligand pour les métaux étudiés (Equation 3. 1).



Equation 3. 1: Définition des équilibres de protonation.

Ces deux techniques ont été utilisées en parallèle afin de déterminer les constantes de protonation des ligands L³ et L⁹ (Figure 3. 8).

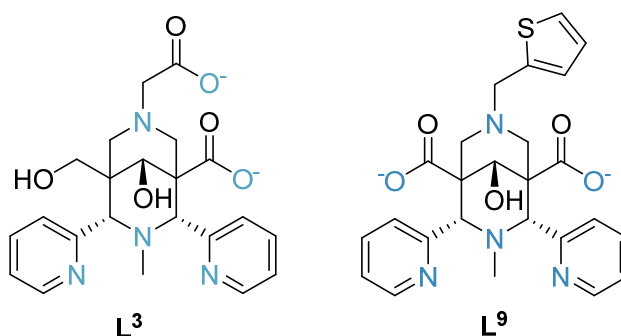


Figure 3. 8: Structures des ligands L³ et L⁹ (formes totalement déprotonées).

Les deux ligands comportent chacun deux acides carboxyliques, deux amines tertiaires et deux amines pyridiniques. Chacun d'entre eux possède donc six sites de protonation.

i. Etudes potentiométriques

La potentiométrie est une technique basée sur la mesure du potentiel électrochimique d'une électrode indicatrice en fonction du volume de titrant ajouté, ici KOH. Les valeurs du potentiel peuvent être converties en pH par étalonnage de l'électrode. Les constantes de protonation des ligands ou de stabilité des complexes peuvent alors être obtenues à partir des concentrations des espèces. On notera que la force ionique des solutions est fixée dans toutes les solutions afin de s'affranchir des facteurs d'activité des ions. Le traitement des données a été effectué avec le logiciel Hyperquad.^{7,8}

Dans le cadre de cette étude, des titrages potentiométriques ont été effectués, dans l'eau à 25°C avec KCl 0,1M comme électrolyte support (Figure 3. 9).

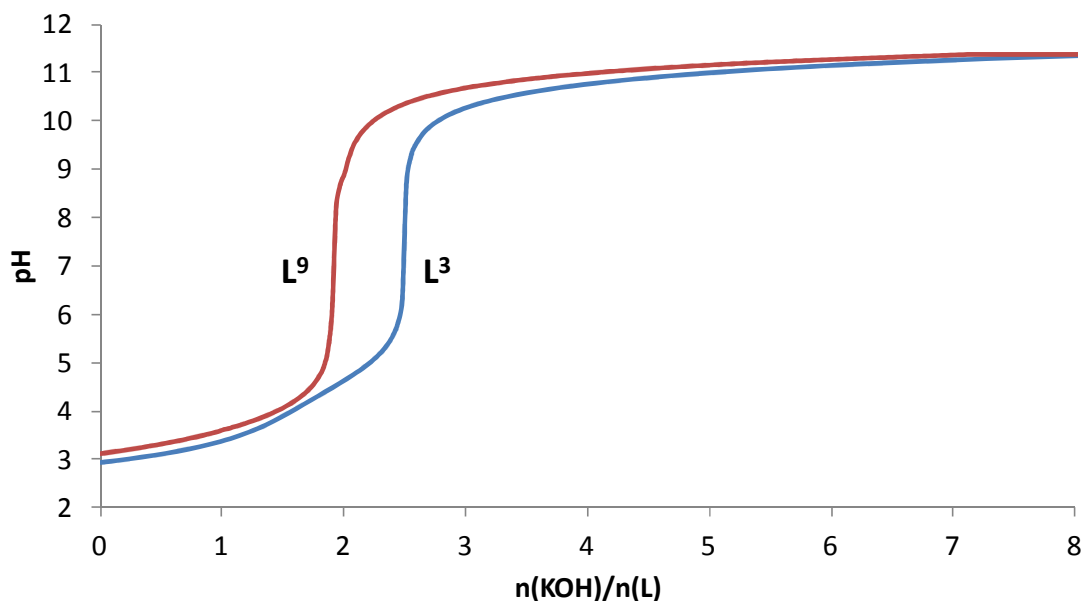


Figure 3. 9: Courbes potentiométriques des ligands L^3 (bleu) et L^9 (rouge). Solvant: H_2O ; $I = 0,1 M$ (KCl); $T = 25^\circ C$; $[L^3]_{tot} = 1,00 \times 10^{-3} M$; $[L^9]_{tot} = 9,64 \times 10^{-4} M$.

Un saut de pH est bien observé dans les deux cas, ce qui indique la présence de fonctions protonables sur la molécule. Trois constantes d'acidité ont été déterminées sur la gamme de pH 2 à 12. Les valeurs sont résumées ci-après (Tableau 3. 2) et correspondent à la moyenne d'au moins trois dosages indépendants.

ii. Etudes spectrophotométriques

Les études potentiométriques ont pu être confirmées par des études spectrophotométriques, en suivant l'influence du pH sur les transitions π - π^* des pyridines.

Ligand L^3

Les études ont débuté par le ligand L^3 . Des titrages spectrophotométriques ont été réalisés entre pH 0 et 12 (Figure 3. 10) par deux techniques différentes. De pH 2 à 12, des titrages « directs » ont été effectués. Cette détermination est réalisée sur une gamme de pH mesurables expérimentalement par les électrodes selon des conditions classiques ($I = 0,1 M$ KCl, $T = 25,0^\circ C$). Le ligand est placé en milieu acide dans un vase de titrage et le pH est ajusté au fur et à mesure vers les pH basiques. Un spectre est réalisé pour chaque valeur de pH choisie afin de suivre l'évolution des variations spectrales en fonction du pH.

Les valeurs de pH entre 0 et 2 ne pouvant être mesurées expérimentalement nous avons utilisé la technique dite de titrage en « batch ».⁹ Pour cette technique, chaque spectre correspond à un échantillon préparé dans une fiole distincte contenant une même concentration de ligand et un $p[H]$ fixé par une quantité d'acide calculée ajoutée ($p[H] = -\log[H^+]$).

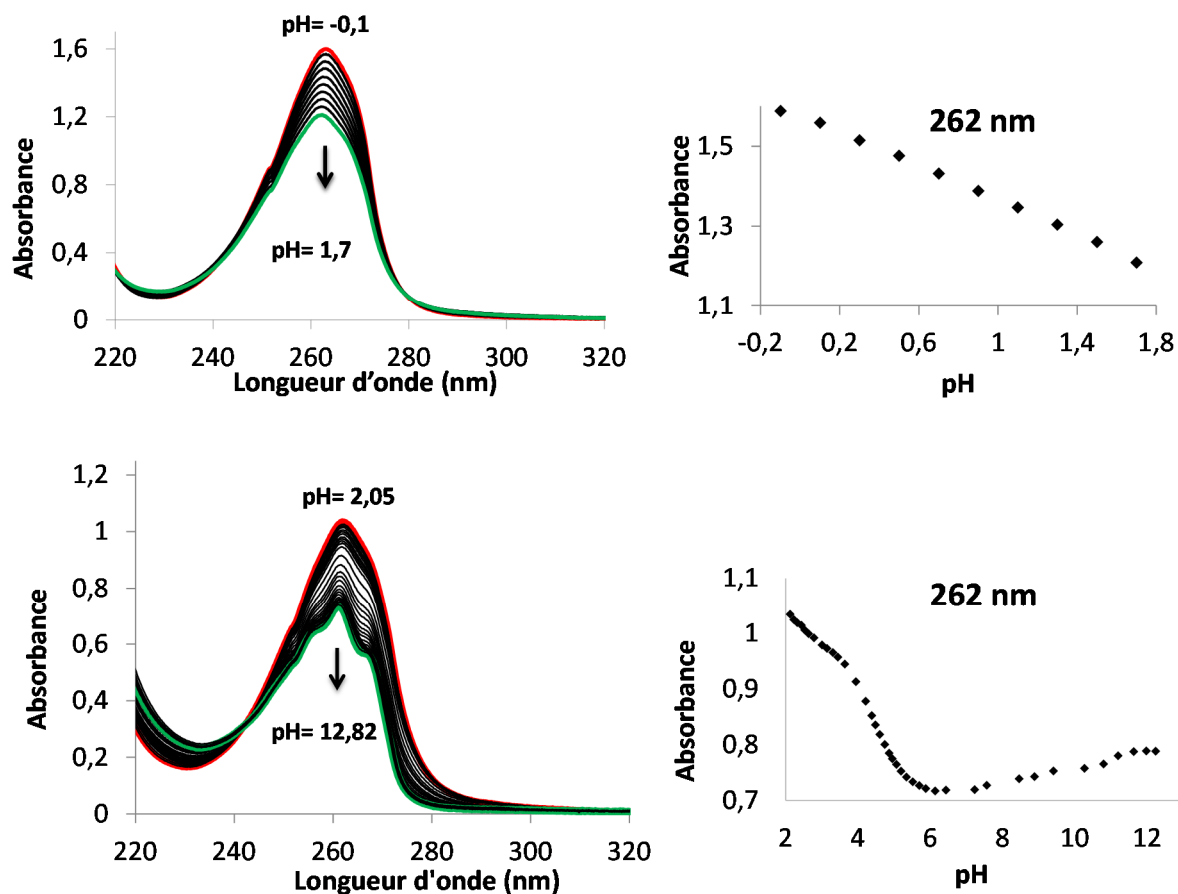


Figure 3. 10: Titrages spectrophotométriques du ligand L^3 . (haut) titrage en batch, $[L^3]_{tot} = 9,81 \times 10^{-5} M$, $-0,1 < p[H] < 1,7$; (bas) titrage direct, $[L^3]_{tot} = 1,01 \times 10^{-4} M$, $2,05 < p[H] < 12,82$. Solvant : H_2O ; $I = 0,1 M$ (KCl); $T = 25^\circ C$.

Ces titrages présentent une seule bande centrée à 260 nm, correspondant aux transitions $\pi-\pi^*$ des groupements pyridines^{10,11} du ligand L^3 . Cette bande présente un déplacement hypochrome lors de l'augmentation du pH. De plus, nous pouvons observer l'apparition d'une structure hyperfine vers les hauts pH qui suggère l'existence de liaisons hydrogène avec les doublets libres des azotes pyridiniques.²¹

Dans la gamme de pH étudiée (pH 0 à 12), quatre constantes de protonation ont pu être déterminées par traitement des données par le logiciel de régression linéaire aux moindres carrés Specfit.^{12,13} Les trois pKa les plus hauts, dans la zone de pH 2 à 12, sont en accord avec les valeurs obtenues par potentiométrie et un quatrième pKa a pu être obtenu grâce à la technique par batch en pH acide (Tableau 3. 2).

Constantes de protonation	$\log K_{LH_x}$			
	L^3	Moyenne		L^9
pK_{a_1}		>12		>12
pK_{a_2}	10,4(3) ^a /10,99(1) ^b	10,6(6)	11,71(7) ^a /11,94(2) ^b	11,8(2)
pK_{a_3}	4,41(5) ^a /4,57(2) ^b	4,5(2)	3,60(9) ^a /3,62(2) ^b	3,6(1)
pK_{a_4}	2,0(2) ^a /2,00(2) ^b	2,0(2)	2,3 (3) ^a /2,38(2) ^b	2,3(3)
pK_{a_5}	0,82(1) ^a	0,82(1)	0,62(7) ^a	0,62(7)
pK_{a_6}		<0,82		<0,62

Solvant: H₂O; I = 0,1M; T = 25,0°C, $K_{LH_x} = [LH_x]/([LH_{x-1}][H])$, Les charges ont été omises pour des raisons de clarté, ^aTitrages spectrophotométriques vs pH, ^btitrages potentiométriques.

Tableau 3. 2: Constantes de protonation successives ($\log K_{LH_x}$) des ligands L^3 et L^9 .

Les valeurs moyennes ont été fixées dans le traitement des données pour la détermination des constantes de complexation. Les spectres électroniques de chaque espèce ont pu être calculés (Figure 3. 11).

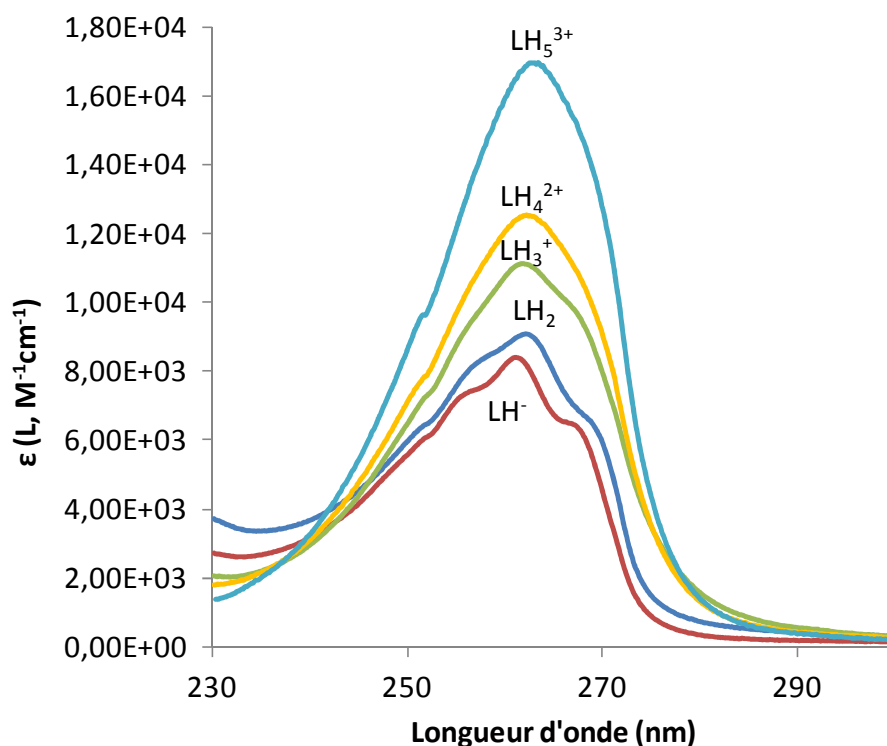


Figure 3. 11: Spectres électroniques du ligand L^3 .

Les spectres électroniques des espèces présentes en pH basique montrent bien l'apparition d'une structure hyperfine à 260 nm, qui avait été observée lors du titrage spectrophotométrique en fonction du pH.

D'autre part, d'après la courbe de distribution des espèces en fonction du pH (calculée avec le logiciel Hyss¹⁴), on remarque qu'à pH physiologique (pH 7,4), une seule espèce protonée est présente (LH₂) (Figure 3. 12).

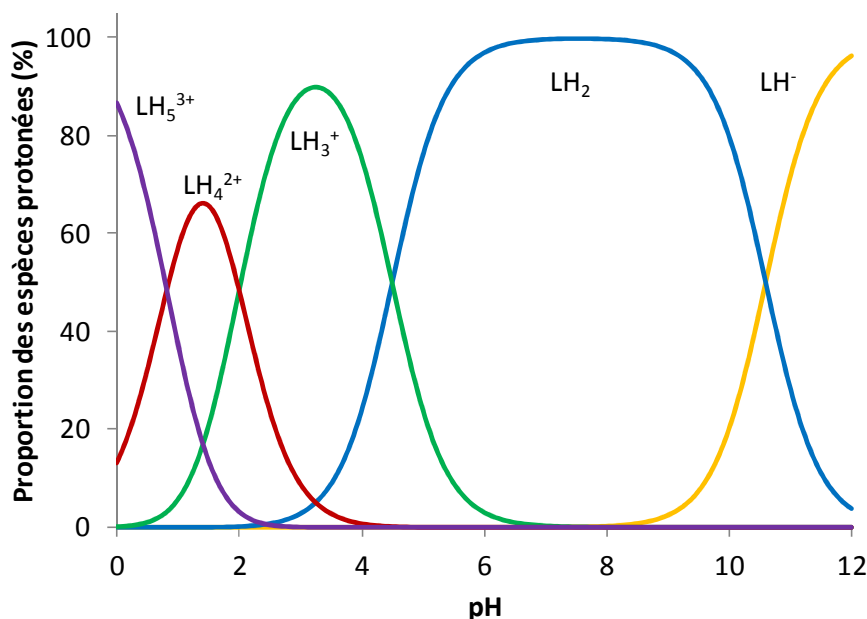
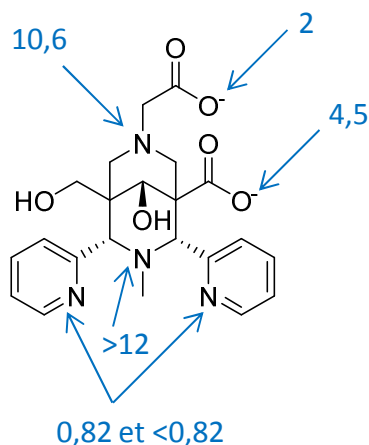


Figure 3. 12: Distribution des espèces protonées du ligand L³ en fonction du pH. Solvant : H₂O; I = 0,1 M (KCl); T = 25°C; [L³]_{tot} = 1 × 10⁻⁴ M.

Nous avons suggéré une attribution des pKa grâce aux données décrites dans la littérature sur des composés similaires^{3,15,16,17,18,19,20,21} (Figure 3. 13, Tableau 3. 3) . Les deux pKa dont les valeurs n'ont pas pu être déterminées correspondent à l'une des deux pyridines (pKa < 0,82) ainsi qu'à l'amine tertiaire en R₁ (pKa > 12). Les pKa₂ et pKa₄ ont été attribués à l'amine tertiaire en R₂ et l'acide carboxylique qu'elle porte, respectivement, par analogie avec la N,N-diméthylglycine. Le pKa₃ a donc été attribué au deuxième acide carboxylique et le pKa₅ est en accord avec la valeur observée pour la N,N'-diméthyl(pyridine-2-yl)méthylamine.


 Figure 3. 13: Attribution des pKa du ligand L³.

Ligand	pKa	Ligand	pKa
	8,93 (amine tertiaire) 5,65/ 1,75 (pyridines) ¹⁵		13,1 (amine tertiaire) ¹⁸
	7,58 (amine tertiaire) 5,52 (pyridine) ³		11,29/ 10,19/ 1,61/ 1,91 (amines tertiaires) ¹⁹
	11,0/ 8,7 (amines tertiaires) ¹⁶		9,77 (amine) 1,90 (acide) ²⁰
	10,9/8,1 (amines tertiaires) ¹⁷		0,9 (pyridine) ²¹

Tableau 3. 3: Constantes de protonation successives de molécules de type mono- et polyamines.

Ligand L⁹

Des variations spectrales similaires ont été observées pour le ligand L⁹ qui présente également une bande centrée à 262 nm correspondant aux transitions π - π^* des groupements pyridines, ainsi qu'une bande supplémentaire à 232 nm, correspondant au groupement thiophène (Figure 3. 14).

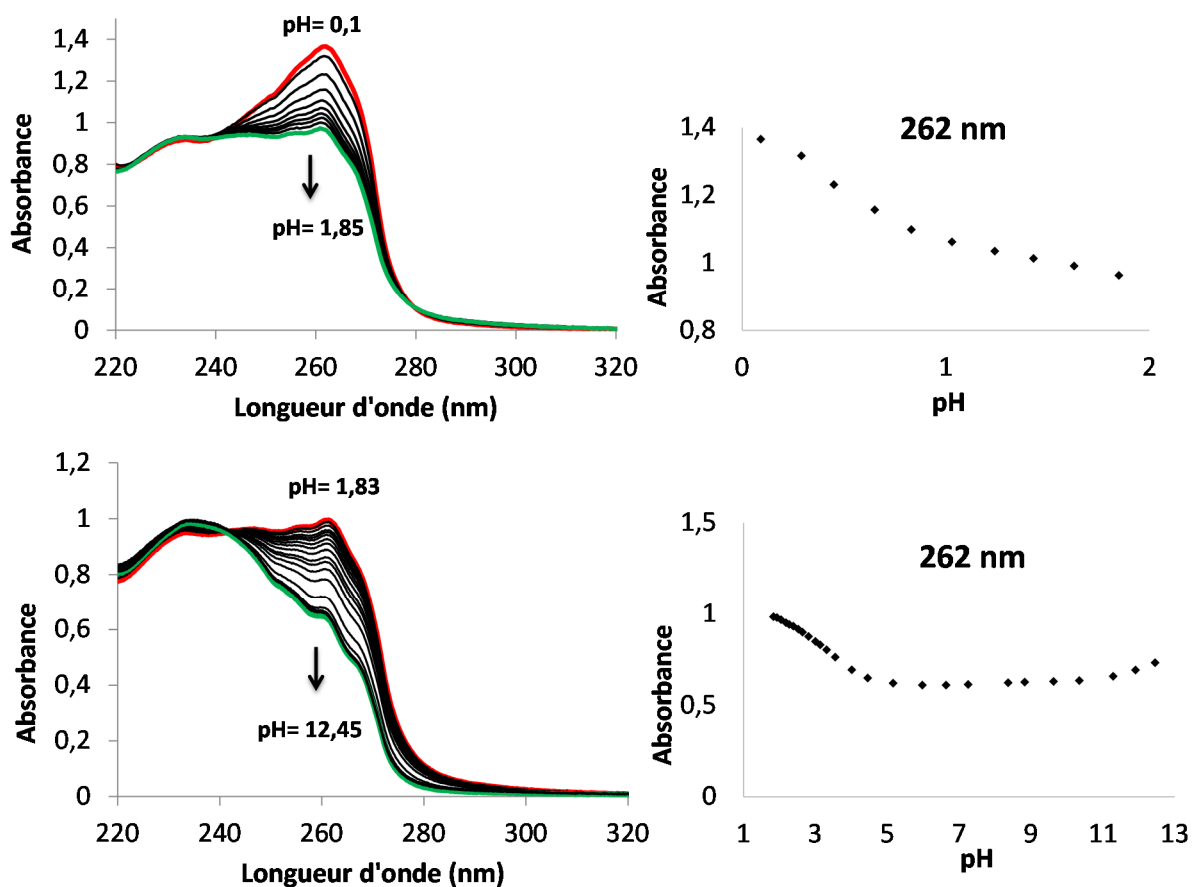


Figure 3. 14: Titrages spectrophotométriques du ligand L^9 . (haut) titrage en batch, $[L^9]_{tot} = 9,04 \times 10^{-5} M$, $-0,10 < p[H] < 1,85$; (bas) titrage direct, $[L^9]_{tot} = 9,71 \times 10^{-5} M$, $1,83 < p[H] < 12,45$. Solvant : H_2O ; $I = 0,1 M$ (KCl); $T = 25^\circ C$.

De même que pour L^3 , quatre pKa ont été déterminés (Tableau 3. 2). Cependant, la molécule étant symétrique, il est difficile de distinguer les deux pKa des acides carboxyliques. Les spectres électroniques ont pu être calculés (Figure 3. 15).

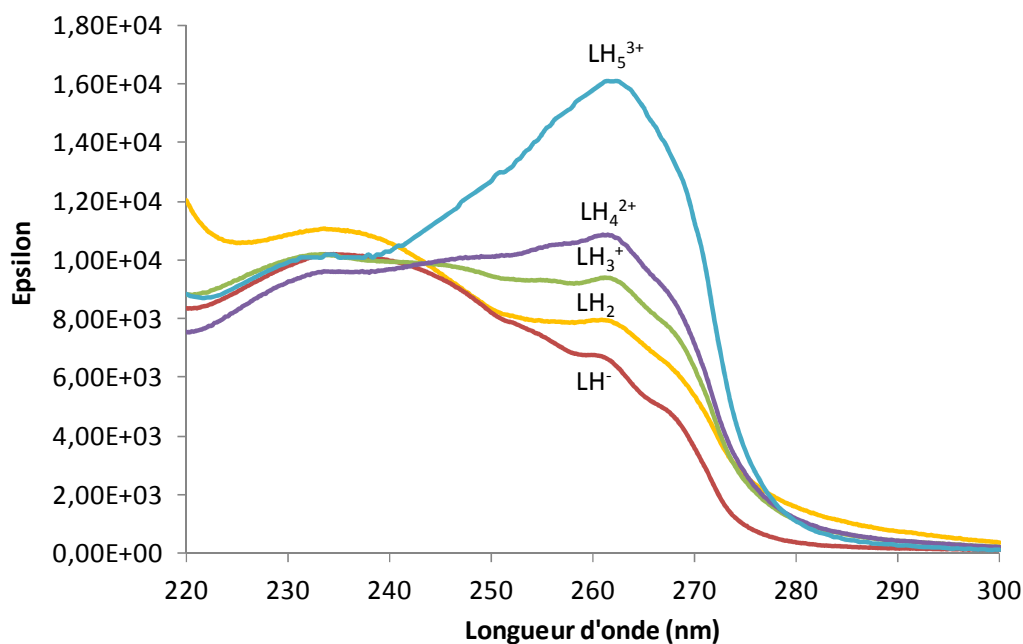


Figure 3. 15: Spectres électroniques des formes protonées du ligand L^9 .

A 230 nm est observée la bande correspondant à l'absorbance due à la présence du motif thiophène, bande qui n'était pas observée dans le cas de L^3 . Celle-ci présente peu de variations car le thiophène est peu impliqué dans les liaisons hydrogènes.

De même que pour le ligand L^3 , la distribution des espèces nous indique, qu'une fois encore, à pH physiologique (pH 7,4), une seule espèce protonée (LH_2) est présente (Figure 3. 16).

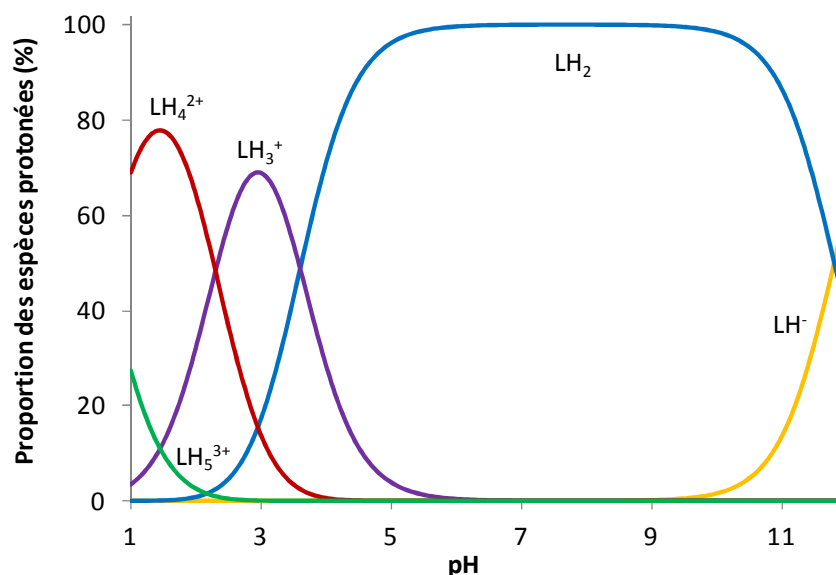


Figure 3. 16: Distribution des espèces protonées du ligand L^9 en fonction du pH. Solvant: H_2O ; $I = 0,1 M$ (KCl); $T = 25^\circ C$; $[L^3]_{tot} = 1 \times 10^{-4} M$.

Comme pour le ligand L³, les deux pKa non-déterminés correspondent à l'une des deux pyridines (~ 0,62) ainsi qu'à la deuxième amine tertiaire (>12) (Figure 3. 17).

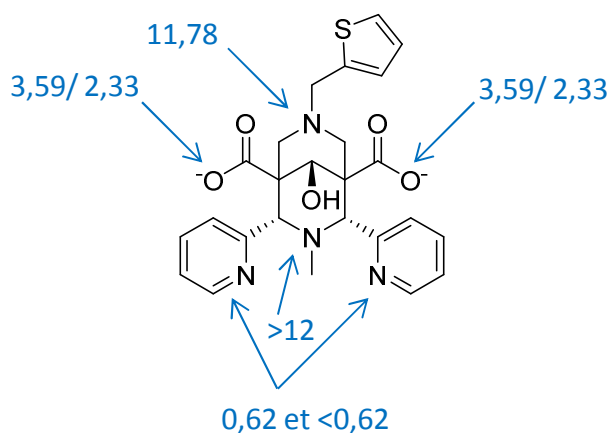


Figure 3. 17: Attribution des pKa du ligand L⁹.

Pour conclure, les ligands L³ et L⁹ possèdent une fonction différente en position R₂ mais dans les deux cas, une seule espèce protonée est présente à pH physiologique. Leurs sphères de coordination diffèrent de par la présence ou l'absence d'une fonction ionisable en position R₂, il est donc difficile de prévoir si leurs propriétés de complexation seront semblables.

b) Propriétés de complexation des ligands L³ et L⁹ pour des métaux divalents

Une fois les constantes de protonation déterminées, nous avons étudié des mélanges in situ de ligands en présence de cuivre(II), zinc(II), nickel(II) et cobalt(II) afin de déterminer les constantes globales de formation (Equation 3. 2).



Equation 3. 2: Constantes globales de formation d'un complexe.

Celles-ci ont pu être déterminées de la même manière que les constantes de protonation, c'est-à-dire par des méthodes potentiométriques et spectrophotométriques en fonction du pH.

Ces titrages ont été effectués avec 0,97 équivalent de métal par rapport au ligand, afin d'éviter des phénomènes de précipitation (occasionnés par la présence de métal libre).²² Des titrages spectrophotométriques par ajout de métal à pH fixe (pH 2 et pH 7,4) ont également été effectués.

Ligand L³

Nous avons tout d'abord étudié la complexation du cuivre(II) par le ligand L³. Cependant, lors des titrages spectrophotométriques en fonction du pH (de 2 à 12), nous avons observé une allure des spectres différente de celle du spectre du ligand libre mais aucune variation spectrale. Le

complexe était donc déjà totalement formé à pH 2. Cela indique une complexation du cuivre(II) très forte, et des titrages en batch à pH acide ont alors été réalisés afin que le complexe ne soit pas déjà totalement formé et ainsi de pouvoir déterminer la valeur de la constante de stabilité.⁹

Le titrage en batch a été réalisé sur une gamme de pH allant de -0,1 à 1,7 (Figure 3. 18). Le suivi de l'absorbance en fonction du pH à 261 nm, nous montre la présence d'un point anguleux qui indique que la complexation est forte car il n'y a plus de changements à partir de pH 1,3.

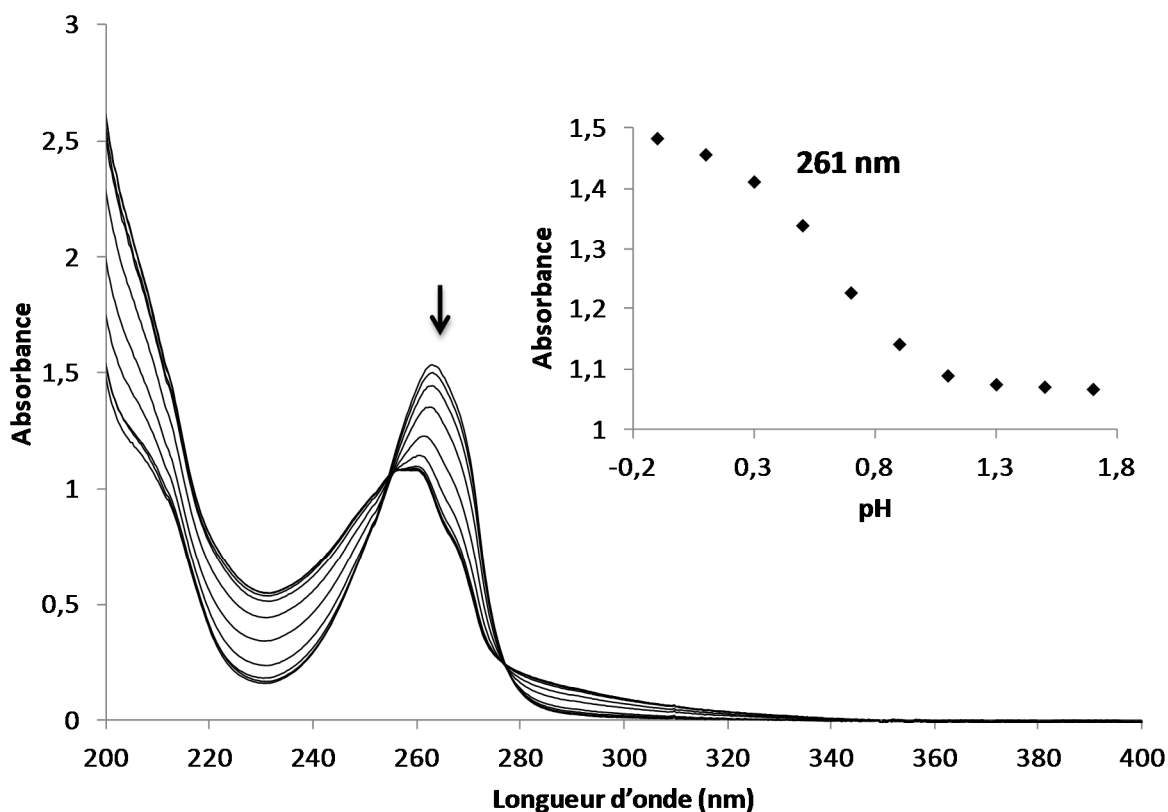


Figure 3. 18: Titration spectrophotométrique en pH acide (-0,1 à 1,7) du complexe CuL^3 . Solvant: $\text{H}_2\text{O} + \text{HClO}_4$; $T=25,0(2)^\circ\text{C}$; $[\text{L}^3]=9,81 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2]=9,61 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Le traitement des données par le logiciel Specfit a mis en évidence la présence d'un seul complexe et d'une seule espèce CuL^3 dont la constante de stabilité est égale à 19,2 (3) (log K). Cette valeur indique une forte complexation du cuivre(II) par notre ligand bispidine L^3 . La sphère de coordination semble donc être bien adaptée pour l'accueil de ce métal. Le spectre électronique du complexe CuL^3 correspond donc aux spectres obtenus après pH 1,3.

D'autre part, un titrage de L^3 par du $\text{Cu}(\text{II})$ à pH 2, a été réalisé et montre une forte complexation du cuivre par le ligand (Figure 3. 19).

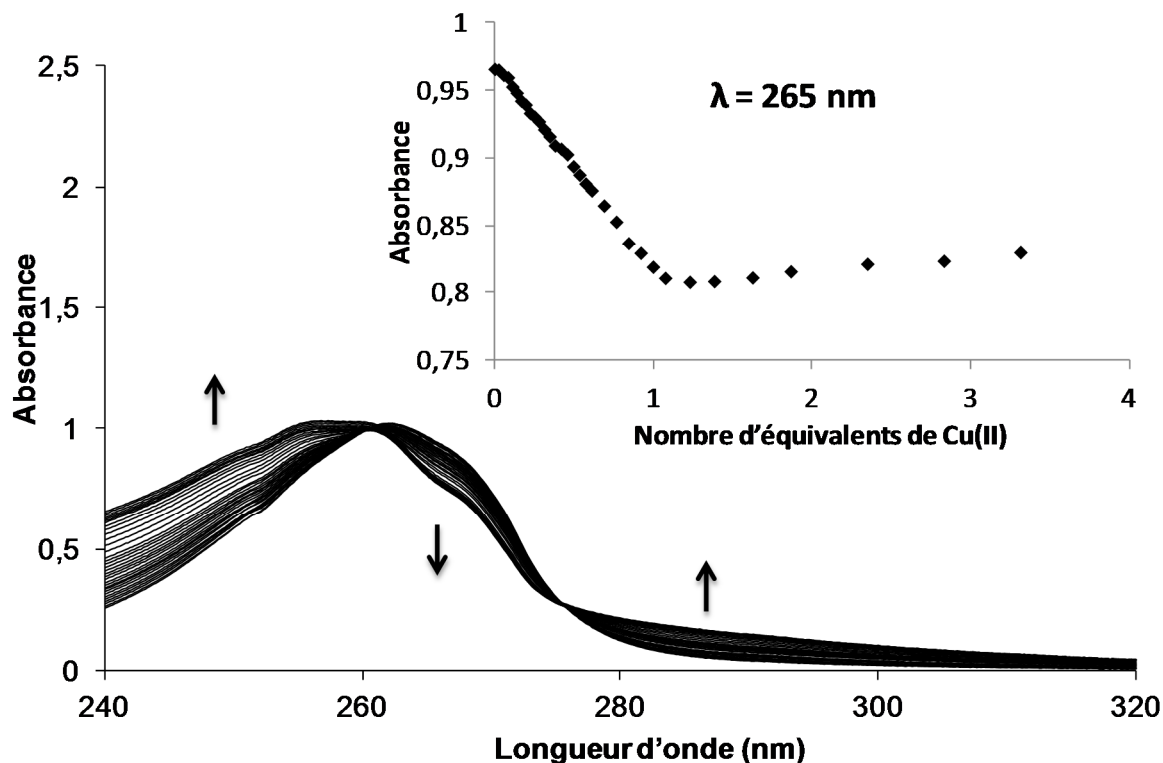


Figure 3. 19: Titration spectrophotométrique de $L^3 + Cu(ClO_4)_2$ à pH 2. Solvant : H_2O ; $I = 0,1 M (KCl)$;
 $T = 25,0(2)^\circ C$; $[L^3]_i = 8,94 \times 10^{-5} M$; $[Cu(ClO_4)_2]_{aj.} = 8,59 \times 10^{-4} M$.

En effet, on observe bien que l'on atteint un plateau à partir d'un équivalent de Cu(II) avec la formation d'un point anguleux. Cette complexation est également rapide puisqu'elle s'effectue en moins de deux minutes, à température ambiante, en pH acide. Ce dernier point est très important dans le cadre de l'imagerie TEP puisque le temps de demi-vie du ^{64}Cu est de 12,7 h.

Pour les trois autres métaux testés (zinc(II), nickel(II) et cobalt(II)), les titrages potentiométriques et spectrophotométriques classiques (pH 2 à 12) ont montré des affinités significativement plus faibles et ont pu être utilisés pour déterminer les constantes thermodynamiques.

Tout d'abord, les titrages potentiométriques ont montré des variations et des comportements différents selon les métaux (Figure 3. 20).

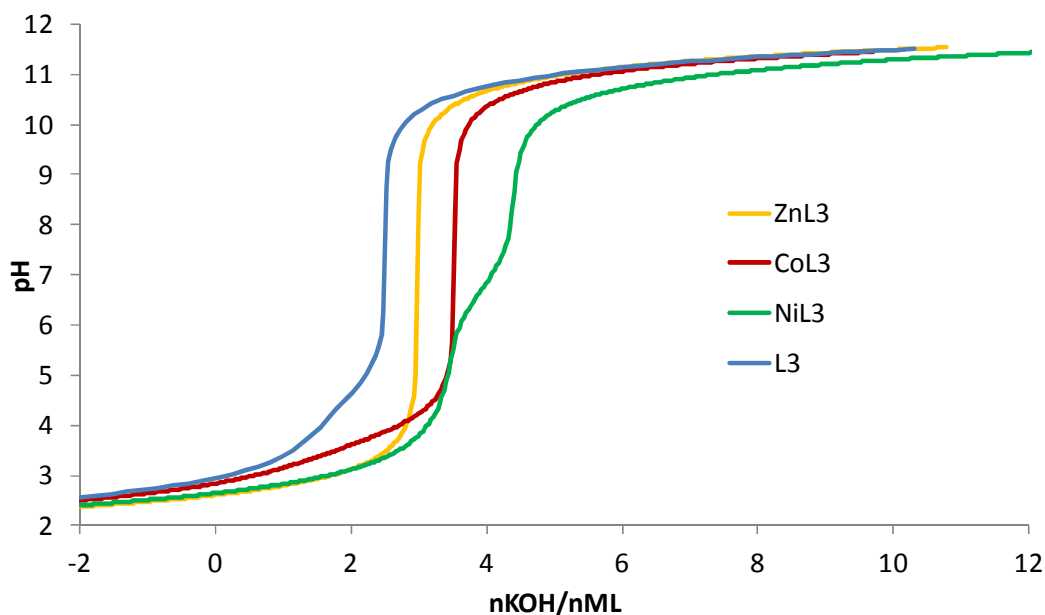


Figure 3. 20: Titrages potentiométriques des différents complexes de L^3 (Zn, Ni et Co). Solvant : H_2O ; $I = 0,1 M$ (KCl) ; $T = 25,0(2)^\circ C$; $[L^3]_i = 8,8 \times 10^{-4} M$; $[M(ClO_4)_2] = 8,2 \times 10^{-4} M$.

La différence de comportement, par rapport au ligand libre, indique bien qu'un phénomène de complexation s'effectue. Dans le cas du nickel, une inflexion indique la présence d'un état de protonation supplémentaire, vraisemblablement NiL^3H . Ceci est également observable dans le cas de CoL^3 , mais de manière moins nette. Le décalage de la courbe du complexe de nickel en fin de titrage suggère également la présence d'une espèce hydroxylée du complexe. La détermination des constantes de complexation par le logiciel Hyperquad7⁸ a pu être réalisée et montre l'existence de plusieurs espèces protonées pour les complexes de cobalt(II) et de nickel(II) (Tableau 3. 4).

Constantes de complexation	$\log \beta_{ML^3}$			
	Cu	Zn	Ni	Co
$\log \beta_{ML}$	19,2(3) ^a	14,45(2) ^b	12,2(3) ^{a,b}	11,69(2) ^b
$\log \beta_{MLH}$			16,7(2) ^{a,b}	15,37(3) ^b
$\log \beta_{MLOH}$			3,4(4) ^{a,b}	

Solvant: H_2O ; $I = 0,1M$; $T = 25,0^\circ C$, $K_{MLH} = [MLH]/([M][L][H])$, Les charges ont été omises pour des raisons de clarté, ^aTitrages spectrophotométriques vs pH, ^bTitrages potentiométriques. Constantes prises en compte dans la détermination des constantes de complexation: $\log K_{Cu(OH)} = -6,29$; $\log K_{Cu(OH)_2} = -13,1$; $\log K_{Zn(OH)} = -7,89$; $\log K_{Zn(OH)_2} = -14,92$; $\log K_{Ni(OH)} = -8,1$; $\log K_{Ni(OH)_2} = -16,87$; $\log K_{Co(OH)} = -6,29$; $\log K_{Co(OH)_2} = -13,1$.

Tableau 3. 4: Constantes de stabilités des complexes ML^3 .

Nous pouvons constater la bonne sélectivité du ligand pour le cuivre(II) par rapport au zinc(II), nickel(II) et cobalt(II) avec une différence de cinq ordres de grandeur ($\log \beta_{ML}$). Cette sélectivité suit la série d'Irving-Williams concernant les métaux possédant une couche électronique d^{10} .²³

Dans le cas du cuivre(II), seule une espèce est formée sur l'ensemble de la gamme de pH. Un titrage du ligand L^3 par $ZnCl_2$ à pH 7,4 a ensuite été effectué (Figure 3. 21).

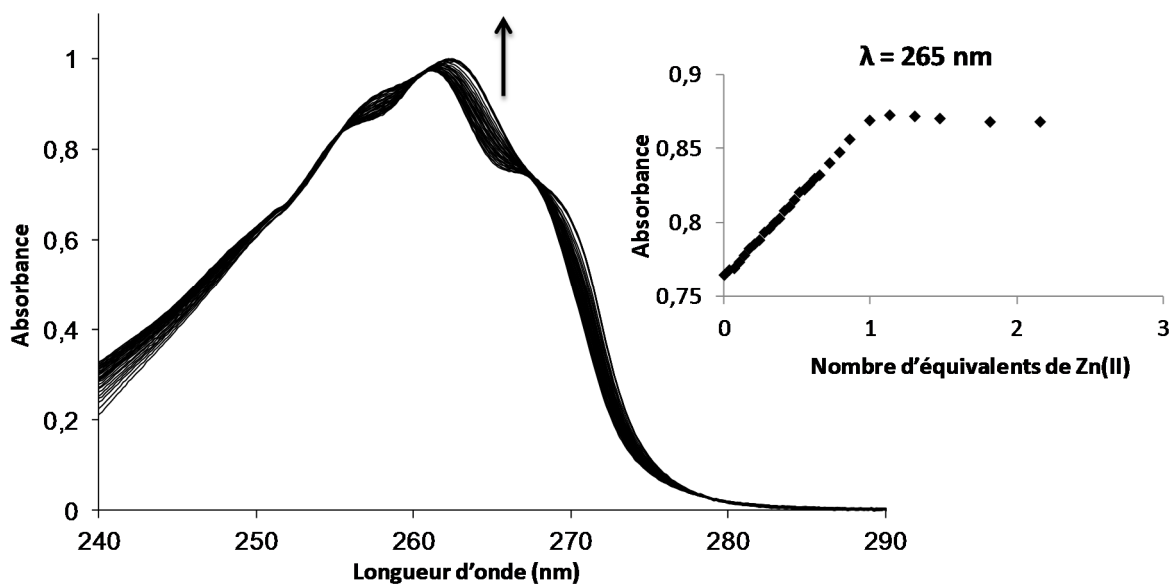


Figure 3. 21: Titrage spectrophotométrique $L^3 + Zn^{II}$ à pH 7,4. Solvant : H_2O ; $I = 0,1 M (KCl)$; $T = 25,0(2)^\circ C$; $[L^3]_i = 1,24 \times 10^{-4} M$; $[Zn(ClO_4)_2]_{aj.} = 8,5 \times 10^{-4} M$.

D'après l'évolution de l'absorbance à 265 nm, on observe bien la formation d'une seule espèce, le complexe 1:1, ce qui était attendu au vu de la sphère de complexation de la bispidine. De plus, la complexation est forte puisque l'on atteint un plateau à 1 équivalent.

Les titrages spectrophotométriques des complexes ML^3 en fonction du pH ont également été effectués (Figure 3. 22, Figure 3. 23, Figure 3. 24). Des variations spectrales sont bien observées pour les trois métaux mais celles-ci étant superposées à celles des espèces protonées du ligand libre, le traitement est délicat et moins fiable que celui des titrages potentiométriques. Dans les cas du $Zn(II)$ et du $Co(II)$, les variations dues aux complexes n'ont pas donné de résultats interprétables et les valeurs présentées correspondent uniquement à celles obtenues à partir des titrages potentiométriques.

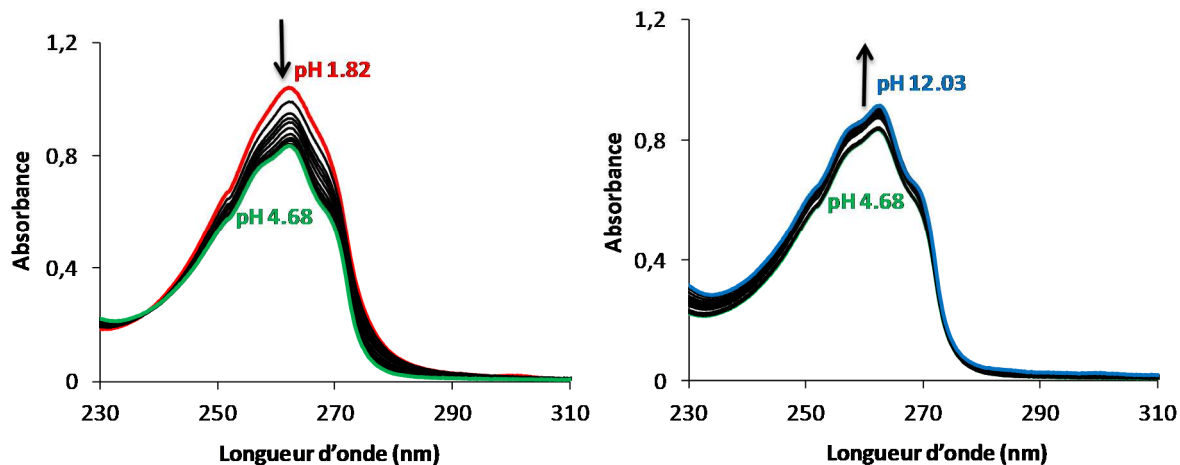


Figure 3. 22: Titrage spectrophotométrique du complexe ZnL^3 en fonction du pH. $[L^3]_{tot} = 1 \times 10^{-4} M$, $[Zn^{II}]_{tot}/[L^3]_{tot}=0,97$, solvant: H_2O , $I=0,1 M$ (KCl), $T=25,0(2)^\circ C$.

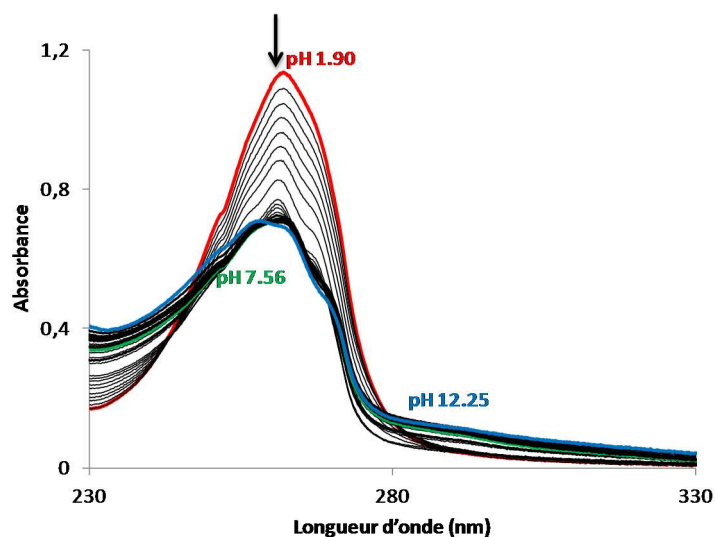


Figure 3. 23: Titrage spectrophotométrique du complexe CoL^3 en fonction du pH. $[L^3]_{tot} = 1 \times 10^{-4} M$, $[Co^{II}]_{tot}/[L^3]_{tot}=0,97$, solvant: H_2O , $I=0,1 M$ (KCl), $T=25,0(2)^\circ C$.

Les variations spectrales étant majoritairement dues à la protonation et non à la complexation, aucun spectre électronique des complexes ZnL^3 et CoL^3 n'a pu être déterminé.

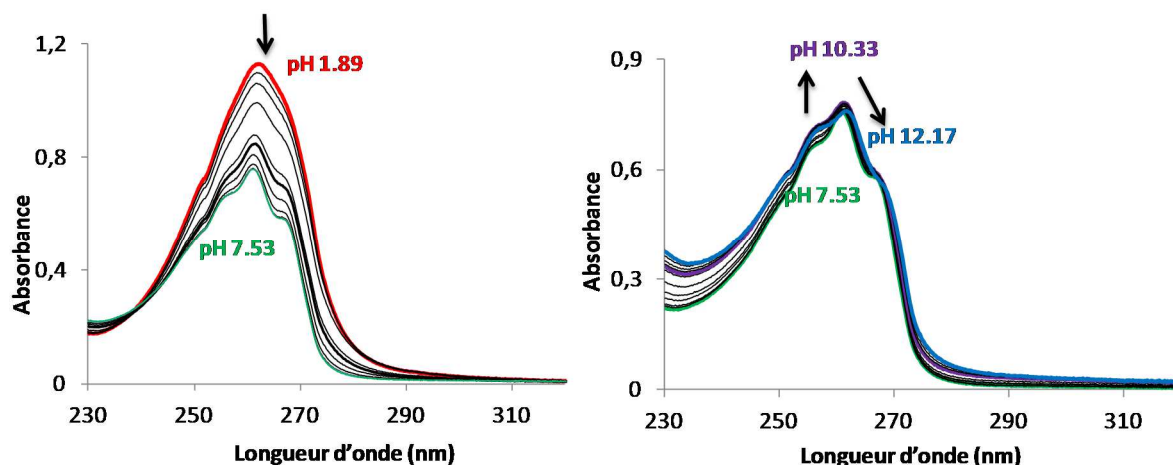


Figure 3. 24: Titrage spectrophotométrique du complexe NiL^3 en fonction du pH. $[\text{L}^3]_{\text{tot}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Ni}^{\text{II}}]_{\text{tot}}/[\text{L}^3]_{\text{tot}}=0,97$, solvant: H_2O , $I=0,1 \text{ M}$ (KCl), $T=25,0(2)^\circ\text{C}$.

Dans le cas du nickel(II), des variations spectrales plus importantes nous ont permis de mettre en évidence un complexe NiL^3 ainsi qu'une espèce protonée et une espèce hydroxylée. Les valeurs obtenues sont en accord avec celles déterminées par les titrages potentiométriques. Au final, il n'y a que pour ce métal que nous avons pu exploiter les données spectrophotométriques et calculer les spectres électroniques des différentes espèces (Figure 3. 25).

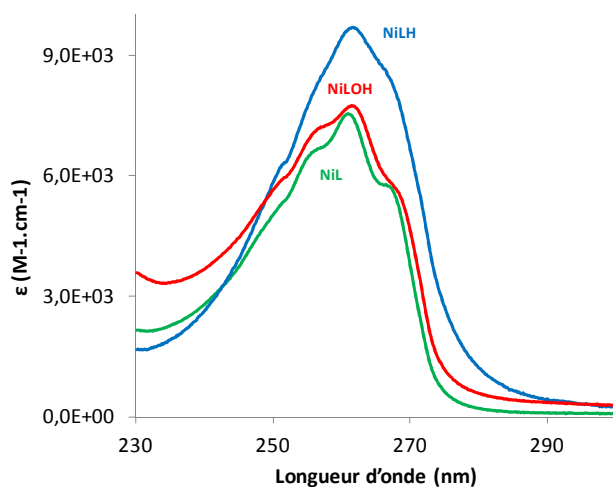


Figure 3. 25: Spectres électroniques des espèces complexées NiL^3

Les courbes de distribution ont pu être calculées grâce au logiciel Hyss¹⁴ et indiquent la prédominance du complexe CuL^3 sur toute la gamme de pH (2 à 12). Cette prédominance est moindre pour les complexes ZnL^3 , NiL^3 et CoL^3 (Figure 3. 26).

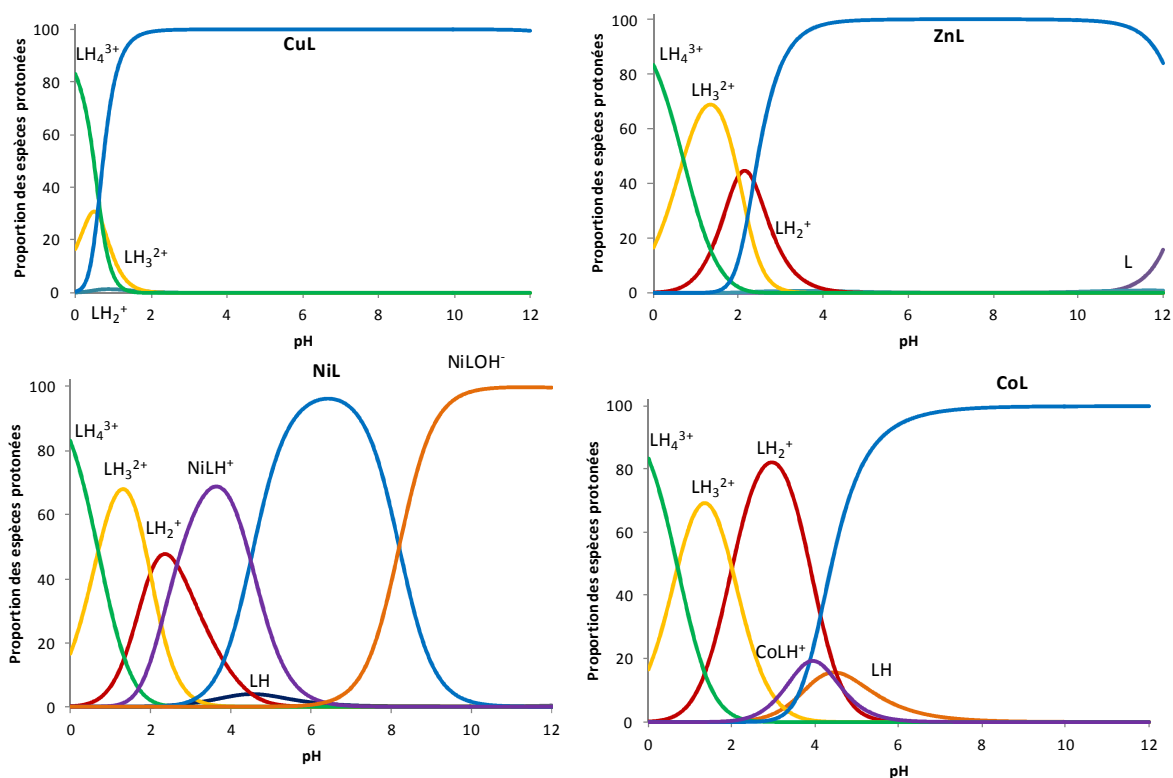


Figure 3. 26: Diagrammes de distribution des espèces CuL^3 , ZnL^3 , NiL^3 et CoL^3 en fonction du pH. Solvant: H_2O ; $I = 0,1 M$ (KCl); $T = 25^\circ C$; $[L^3]_{tot} = 1 \times 10^{-4} M$.

Cette existence du complexe de cuivre(II) de pH 2 à 12 est une notion importante en tant que chélatant pour l'imagerie TEP. Tout d'abord, *in vivo*, la valeur du pH dans le corps humain n'est pas la même partout. Celle-ci est maintenue à pH 7,4 dans le sang et les tissus sains mais est plus faible dans les tissus tumoraux, l'intestin (4 à 7), l'estomac supérieur (4 à 6,5) et l'estomac inférieur (1,5 à 4).²⁴ D'autre part, lors de la purification du cuivre 64, ce dernier est passé sur des résines échangeuses d'anions et récupéré dans une solution d'HCl concentré.^{25,26} La réaction de radioméallation est donc plus facile à mettre en œuvre à pH acide. Le diagramme de distribution du complexe de Cu(II) montre donc que le complexe est totalement formé à pH acide (et par conséquent, non dissocié). Excepté dans le cas du nickel(II), il n'y a qu'une seule espèce en présence pour chaque complexe à pH physiologique (pH 7,4). Pour le nickel, deux espèces coexistent à pH 7,4, l'espèce NiL^3 et l'espèce hydroxylée $NiL^3(OH)$.

De plus, afin d'obtenir des informations sur la géométrie des complexes de cuivre(II), des titrages spectrophotométriques en fonction du pH, centrés sur les bandes d-d du Cu(II), ont été effectués. Dans le cas du ligand L^3 , aucun déplacement des bandes d-d du Cu(II) n'est observé (Figure 3. 27).

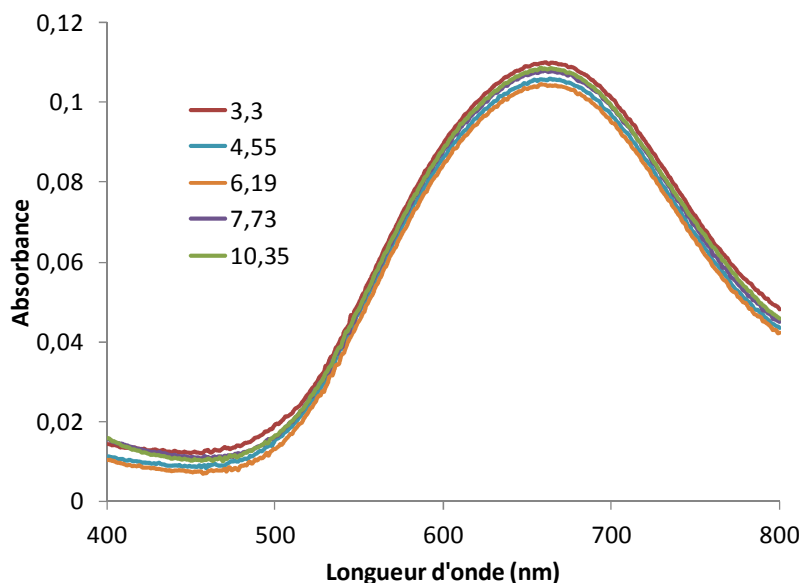


Figure 3. 27: Titration spectrophotométrique du complexe CuL^3 en fonction du pH. Solvant: H_2O ; $T=25,0(2)^\circ\text{C}$; $[\text{L}^3]=1,03 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2]=9,66 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Ceci est en accord avec l'obtention d'une seule forme complexée, qui conserve sa géométrie sur toute la gamme de pH étudiée. De plus, la position du maximum, à 665 nm, suggère que l'on se trouve dans une géométrie pyramidale à base carrée.²⁷

Ligand L^9

Les propriétés de coordination du ligand L^9 ont également été étudiées. Nous avons cependant rapidement constaté que la cinétique de complexation du cuivre(II) était bien plus lente à pH acide dans le cas de ce ligand par rapport au ligand L^3 . En effet, lors des titrages spectrophotométriques à pH 2, le signal met plusieurs heures avant de se stabiliser. Les études potentiométriques n'étaient donc pas envisageables du fait de cette cinétique lente et nous avons travaillé en batch en spectrophotométrie UV-visible à pH acide afin de pouvoir déterminer la constante de complexation du cuivre(II).

Le titrage du complexe CuL^9 a été effectué entre pH -0,3 et 1,9 ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$) (Figure 3. 28).

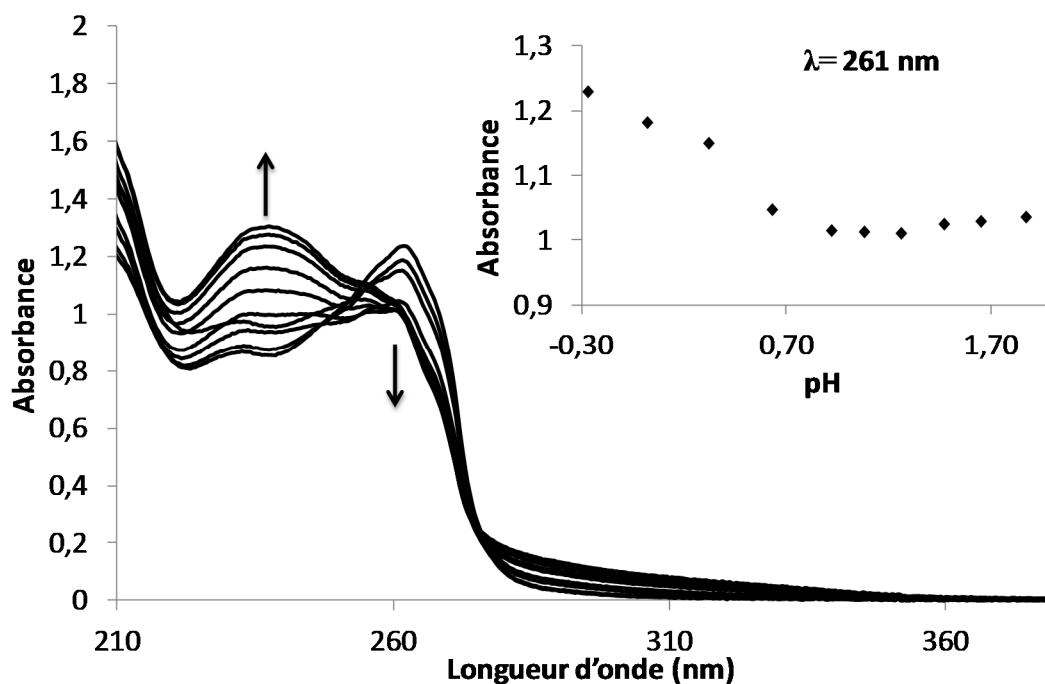


Figure 3. 28: Titration spectrophotométrique en batch du complexe CuL^9 de pH -0,3 à 1,9. Solvant: $\text{H}_2\text{O} + \text{HClO}_4$; $T=25,0(2)^\circ\text{C}$; $[\text{L}^3]=9,04 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2]=8,64 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Le traitement des données a mis en évidence la formation d'un seul complexe CuL^9 dont la constante a pu être déterminée et est égale à 19,4(1) ($\log K_{\text{CuL}^9}$). Elle est donc similaire à celle obtenue pour le complexe CuL^3 ($\log K_{\text{CuL}^3} = 19,2(3)$). La complexation du Cu(II) est donc aussi forte mais une réorganisation lente est observée. Ceci pourrait s'expliquer par la structure du ligand. Dans le cas du ligand L^9 , le motif thiophène ne viendrait pas instantanément se replier pour coordiner le cuivre(II). On notera que les variations au niveau de la bande du thiophène, non observées lors du titrage du ligand libre (Figure 3. 14) suggèrent bien une participation de celui-ci à la coordination du Cu(II).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la géométrie adoptée par le complexe CuL^9 en étudiant les variations spectrales des bandes d-d du Cu(II). Dans le cas de ce ligand, on retrouve vraisemblablement la même géométrie que pour CuL^3 (Figure 3. 29).

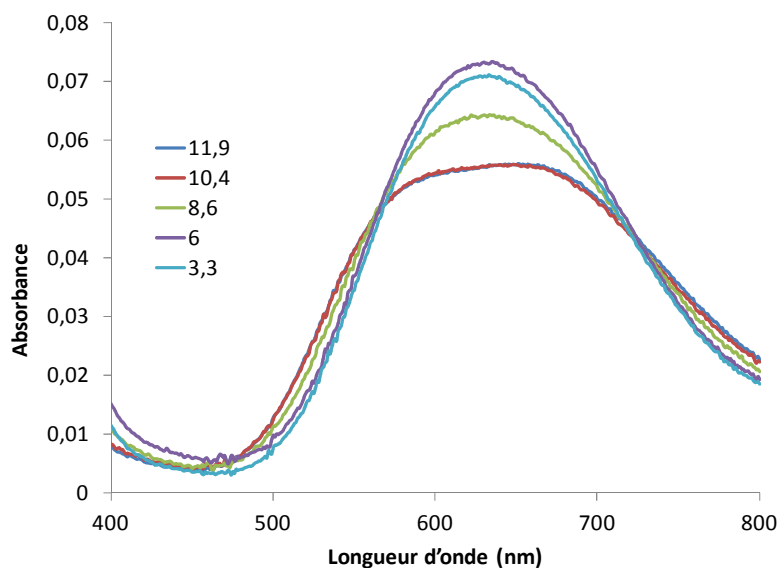


Figure 3. 29: Titrage spectrophotométrique du complexe CuL^9 en fonction du pH. Solvant: H_2O ; $T=25,0(2)^\circ C$; $[L^9]=7,14 \times 10^{-4} M$; $[Cu(ClO_4)_2]=6,96 \times 10^{-4} M$.

Le maximum d'absorption se trouve à 630 nm, ce qui suggère également une géométrie pyramidale à base carrée. La différence d'absorbance en fonction du pH et le léger déplacement de la bande à pH basique, peuvent provenir d'une distorsion plus ou moins importante de la pyramide, suivant la protonation de la molécule, ou de la formation d'une espèce hydroxylée avec un groupement OH^- remplaçant un bras du ligand (sans modification de la géométrie).

Le pouvoir complexant des chélateurs à pH physiologique est classiquement quantifié à l'aide de la détermination du pM, introduit par K.N. Raymond et C.J. Carrano en 1979²⁸ (Equation 3. 3).

$$pM = -\log [M^{2+}]_{\text{libre}} \quad \text{avec } [M]_{\text{tot}} = 10^{-6} M \text{ et } [L]_{\text{tot}} = 10^{-5} M, \text{ à pH } 7,4$$

Equation 3. 3: Définition du pM.

Le pM représente la quantité de métal libre en solution en fonction du pH. Plus le pM est élevé à un pH donné, plus la complexation du métal sera élevée. D'autre part, plus la différence de pM est importante entre le métal d'intérêt et les autres métaux pouvant être présents, plus la sélectivité pour ce métal sera grande. Nous avons donc calculé les différents pM et les avons comparés à des données de la littérature^{3,29,30,31,32,33} (Tableau 3. 5).

	pCu	pZn	pCo	pNi	$t_{1/2}$	E_{red} (mV)/NHE
L ³	17,0	12,2	10,6	10,0	110 j (5M HClO ₄ , 298K) 4h30 (5M HClO ₄ , 363K)	-560
L ⁹	15,9				140 j (5M HClO ₄ , 298K)	
L1 (Comba) ³	15,8	10,6	6,0	/		-225
L3 (Comba) ³	18,9	8,9	6,9	6,9		-323
cyclam ³¹	20,8				3,8min (5M HCl, 363K)	-480 (irr)
No1pa2py ²⁹	17,8	13,3	/	/	204 min (3M HCl, 363K)	-518
H ₂ L ³⁰	12,11	5,06	/	/	30,8 j (12M HCl, 363K)	-444, -588 (irr)
CB-TE2A ^{31,32}					154h (5M HCl, 363K)	-880 (E ^{1/2})
HL2 ³³	18,64	12,00			144 min (5M HClO ₄ , 298K)	-420 (E ^{1/2}) (CH ₃ CN)

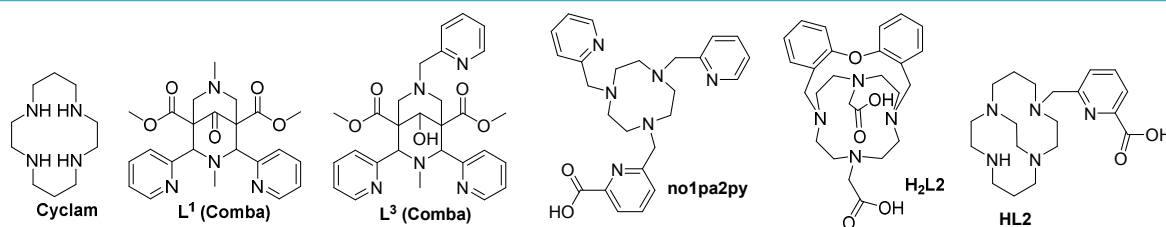


Tableau 3. 5: Valeurs de pM calculées ($M = \text{Cu(II)}, \text{Zn(II)}, \text{Ni(II)}, \text{Co(II)}$), temps de demi-vie en solution acide ($t_{1/2}$) et potentiel d'oxydo-réduction dans H₂O (E_{red}). Structures des ligands de la littérature.

Le pCu obtenu dans le cas de notre ligand pentadentate L³ est plus élevé que celui du ligand tétradentate L1 (Comba). L'apport d'une fonction de coordination supplémentaire permet donc d'augmenter l'affinité pour le cuivre(II). Ceci est cohérent avec le pCu du ligand pentadentate L3 (Comba) qui présente lui aussi un pCu plus élevé que L1 (Comba). La sélectivité de notre ligand est également bonne avec une différence de plus de cinq ordres de grandeurs entre le pM du Cu(II) et celui des autres métaux étudiés. Dans le cas du ligand CB-TE2A, la complexation pour le cuivre(II) est très forte et l'inertie cinétique du complexe très élevée ; mais la cinétique de complexation est très lente et il est nécessaire de chauffer à 90°C.³⁴ Ces conditions de complexation ne sont pas compatibles avec la fonctionnalisation du ligand sur des anticorps par exemple, et limite donc l'utilisation de ce ligand pour le ciblage malgré ses qualités indéniables de complexation.

Cinétique de décomplexation des ligands L³ et L⁹

Afin d'éviter leur dissociation dans la matrice extracellulaire, les complexes doivent non seulement posséder un pCu élevé et une bonne sélectivité mais également une bonne inertie

cinétique. L'inertie cinétique des complexes de cuivre(II) est en général évaluée par la mesure du temps de demi-vie en milieu très acide.

Le complexe CuL^3 a donc été formé puis placé en milieu 5M HClO_4 à température ambiante. La dissociation du métal a été suivie par spectrophotométrie UV-visible sur plusieurs mois (Figure 3. 30).

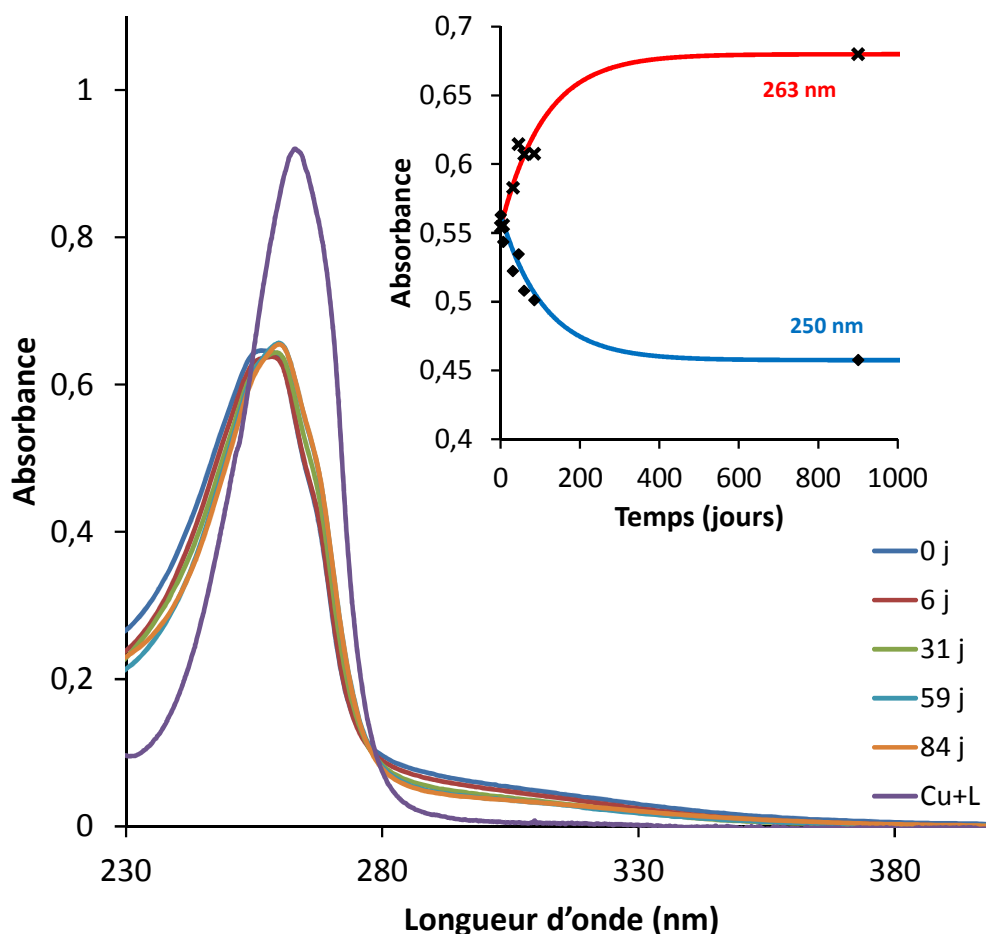


Figure 3. 30: Suivi du spectre d'absorption lors de la décomplexation de CuL^3 en milieu acide en jours (solvant : HClO_4 5M, $[\text{CuL}^3] = 5,48 \times 10^{-5} \text{ M}$).

Nous avons pu constater une variation dans l'allure du spectre. En effet, le maximum d'absorbance évolue vers la formation du ligand L^3 au détriment du complexe CuL^3 , ceci traduisant bien la dissociation de celui-ci. Le calcul a été fait à partir des absorbances à 263 et 250 nm, et le temps de demi-vie calculé grâce à ces courbes est de 110 jours.

Pour conclure sur le ligand L^3 , celui-ci forme un complexe stable avec le cuivre(II), avec une bonne inertie cinétique en milieu acide. De plus, le ligand est sélectif du cuivre(II) et le complexe bien à pH acide.

Une étude sur la cinétique de dissociation du complexe a également été réalisée pour le complexe CuL^9 (Figure 3. 31).

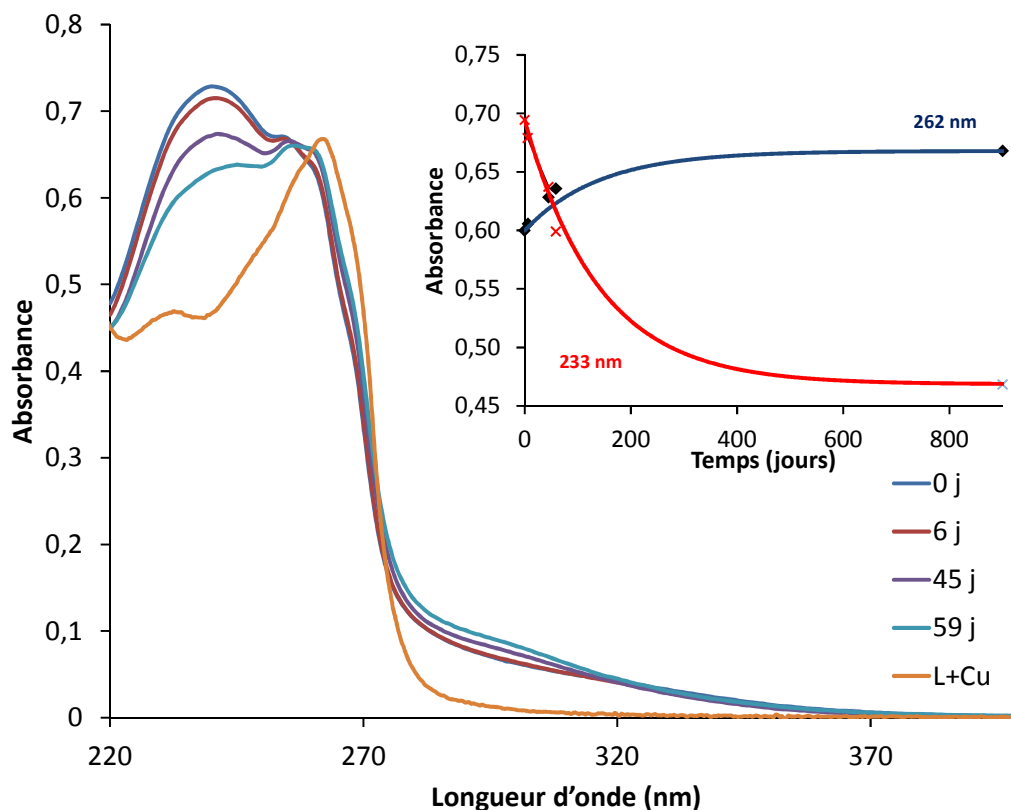


Figure 3. 31: Suivi des bandes de transition lors de la décomplexation de CuL^9 en milieu acide en jours (solvant : HClO_4 5M, $[\text{CuL}^9] = 4,97 \times 10^{-5}$ M).

Dans le cas de ce complexe, une décomplexation lente est également observée et le temps de demi-vie calculé est de 140 jours.

Pour conclure sur le ligand L^9 , celui-ci ne semble pas présenter des caractéristiques optimales dans le cadre d'applications en imagerie TEP à cause de sa cinétique de réorganisation. Le temps de demi-vie du ^{64}Cu étant de 12,7 h, la réorganisation du complexe de cuivre(II) est bien trop lente. Cependant, il est intéressant de constater que la présence d'un motif thiophène à la place d'un groupement carboxylate, ne diminue pas l'affinité du métal pour le ligand. Ceci est en accord avec le caractère frontière du soufre, qui possède donc une certaine affinité pour le cuivre(II) lui aussi classé comme cation frontière.

C'est l'ensemble des données cinétiques et thermodynamiques qui vont permettre d'évaluer le potentiel d'un ligand pour son application en imagerie TEP. En effet, dans le cas du ligand cyclam, le $p\text{Cu}$ est très élevé mais le temps de demi-vie est assez court dans 5M HCl, à 90°C (3,8 min). Un autre point particulièrement important pour l'application des complexes de

cuivre(II) en imagerie TEP est de contrôler i) soit l'absence de réduction du cuivre(II) en milieu biologique, ii) soit de s'assurer que le ligand peut également complexer le cuivre(I), afin d'éviter son relargage.³⁵ Par exemple, le ligand H₂L2 présente, certes une grande sélectivité ($\Delta pCu-Zn = 7$), mais ne possède pas un système quasi-réversible (Tableau 3. 5). Ce dernier point est très important puisque le corps humain présente de nombreuses régions où l'environnement est particulièrement réducteur. Il est donc nécessaire que le système soit (quasi-)réversible afin que le ⁶⁴Cu^{II} réduit en ⁶⁴Cu^I ne soit pas relargué dans le milieu biologique. Pour cela des mesures par voltampérométrie ont été réalisées sur les ligands L³ et L⁶.

c) Etudes électrochimiques

De nombreux systèmes biologiques présents dans le corps sont capables de réduire ou de provoquer un échange du métal. Il est donc nécessaire que le potentiel du complexe soit inférieur à celui des réducteurs physiologiques (Figure 3. 32).

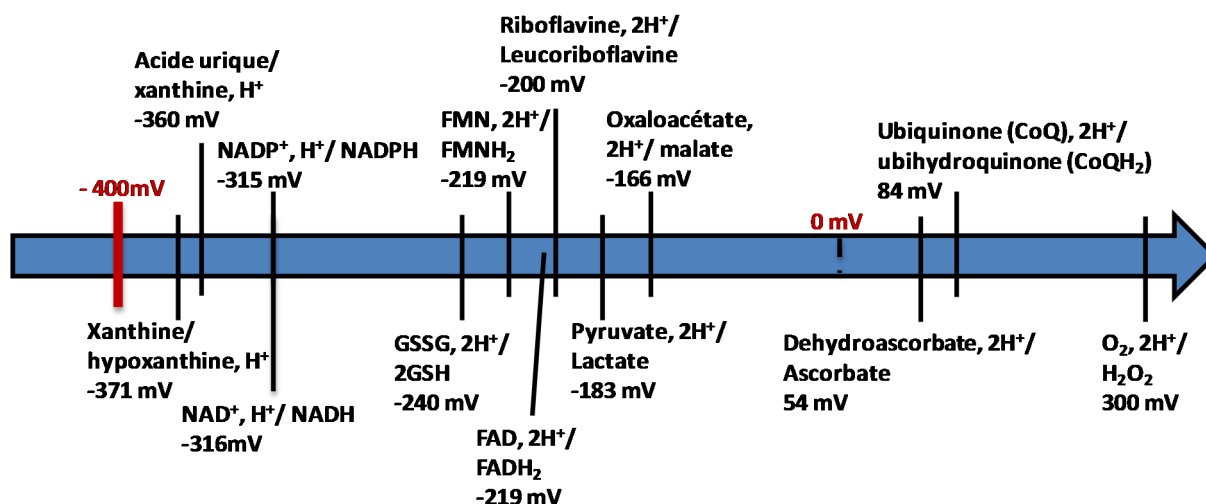


Figure 3. 32: Echelle de potentiel d'oxydo-réduction à mi-vague E° des systèmes biologiques (pH 7,0, 25°C)^{36,37}.

D'après cette échelle, on peut constater que le potentiel d'oxydo-réduction (E°) de notre complexe de cuivre doit être inférieur à -400 mV afin de ne pas interférer avec les réducteurs biologiques. Il est donc capital de caractériser les propriétés électrochimiques de nos complexes. Des études ont été effectuées sur les ligands L³ et L⁶ afin d'évaluer le potentiel oxydo-réducteur des complexes de cuivre(II).

Dans la plupart des cas, ces milieux vont entraîner la réduction du Cu(II) complexé en Cu(I). Cependant ces deux espèces du cuivre, n'ayant pas la même configuration électronique, ne possèdent pas des affinités similaires pour les sites de coordination. Le cuivre(I) va être

beaucoup plus labile, ce qui dans certains cas, peut entraîner une dissociation du métal, et par conséquent le relargage du ^{64}Cu toxique *in vivo*. Il est donc nécessaire de vérifier par des études électrochimiques que, si le cuivre(II) est réduit, il reste tout de même bien complexé par le ligand.

i. Principe de la voltampérométrie

La voltampérométrie est une technique qui consiste à mesurer les variations d'intensité de courant électrique induites par une variation du potentiel électrochimique de la solution. Ces variations d'intensité sont reliées à la charge des espèces en solution et donc à leur état d'oxydation. Le tracé de la courbe $I = f(E)$ permet de déterminer le potentiel réducteur du complexe ainsi que la nature du système (irréversible, quasi-réversible ou réversible). L'intensité du courant résulte de deux paramètres : la vitesse de diffusion de l'espèce près de l'électrode et la vitesse de transfert électronique dans la réaction électrochimique à la surface de l'électrode (Equation 3. 4).

$$i_p = (2,69 \times 10^{-5}).n^{3/2}.A.D^{1/2}.[\text{ligand}].v^{1/2}$$

Equation 3. 4: Equations de Cottrell et Randles-Sevcik.^{38,39}

Dans notre cas, deux techniques ont été utilisées : la voltampérométrie cyclique et la voltampérométrie à ondes carrées. La première méthode consiste à faire varier le potentiel en effectuant des allers-retours entre les hauts et les bas potentiels de manière répétée. On peut ainsi observer le comportement du système dans le temps et voir s'il y a dégradation de celui-ci (démétallation) ou si la réaction d'oxydo-réduction est réversible. Suivant le comportement du système, on pourra observer différents voltampérogrammes (Figure 3. 33).

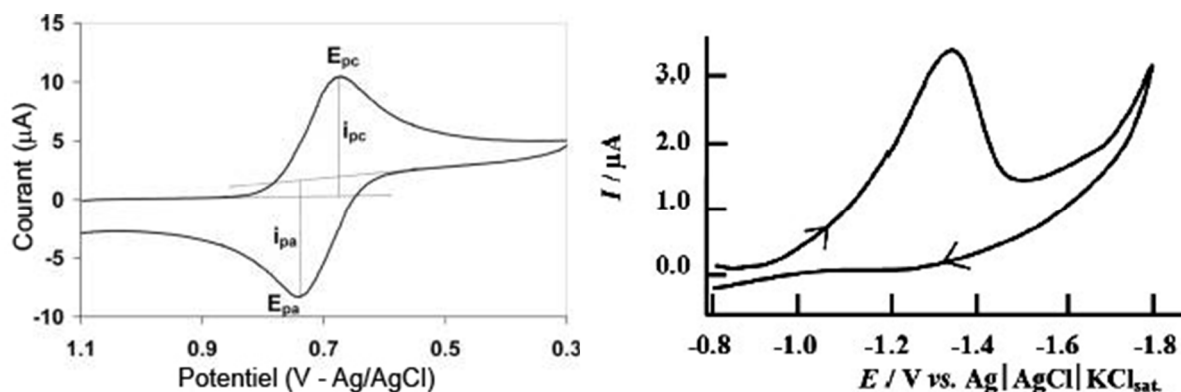


Figure 3. 33: Exemples de voltampérogrammes: système réversible (gauche), système irréversible (droite).

Dans le cas du système réversible, la relation qui s'établit est la loi de Nernst (Equation 3. 5).

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Equation 3. 5: Loi de Nernst avec $R = 8,314 \text{ J.mol}^{-1}.K^{-1}$, constante des gaz parfaits, $F =$ constante de Faraday (96845 C), $T =$ température (K) et E_0 , le potentiel standard.

Cette relation permet de déterminer le nombre d'électrons échangés durant la réaction électrochimique (n).

La deuxième technique utilisée est la voltampérométrie à ondes carrées (SWV). Elle consiste à mesurer la différence entre le courant capacitif (courant électrique associé à la charge ou à la décharge de la double couche électrochimique) et le courant faradique (courant associé au transfert de charge à une interface métal/solution), lors de chaque impulsion effectuée pendant la mesure. Cette méthode permet d'obtenir directement le potentiel standard du couple étudié, si on se trouve dans le cas d'une réaction réversible (Figure 3. 34).

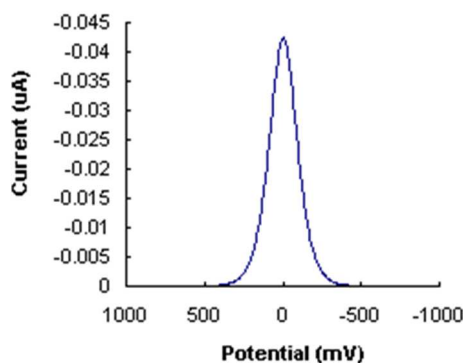


Figure 3. 34: Spectre SWV d'une réaction réversible.

Dans ce cas, le maximum du pic correspond au potentiel standard du couple étudié. De plus, la largeur à mi-hauteur permet de déterminer le nombre d'électrons échangés pendant la réaction selon la relation $L^{1/2} = 3,52RT/nF$.

ii. Propriétés électrochimiques du complexe CuL^3

Des balayages en voltampérométrie cyclique ont été effectués et ont montré une réversibilité du système (Figure 3. 35).

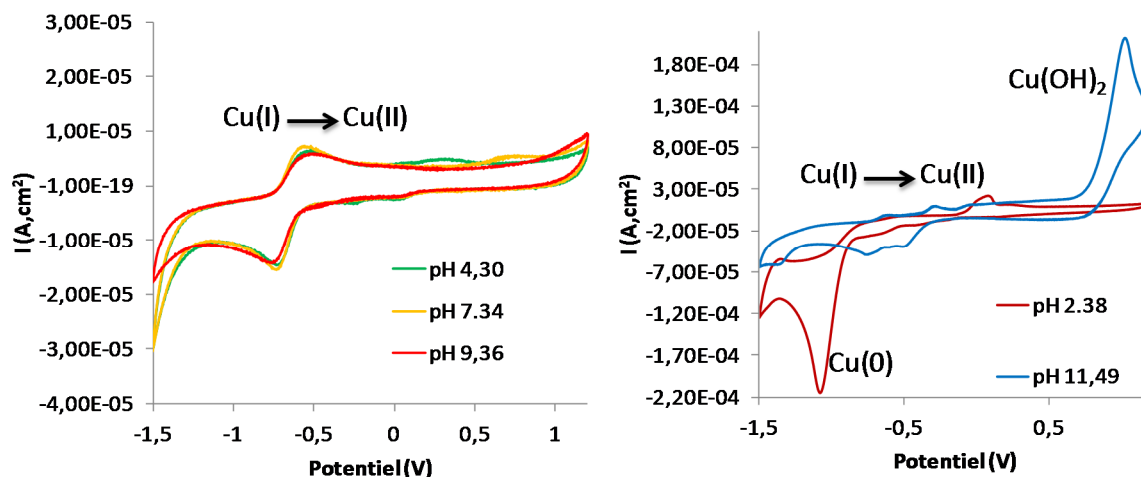


Figure 3. 35: Voltampérogrammes cycliques de solutions de CuL^3 à différentes valeurs de pH ($v = 200 \text{ mV/s}$).
Solvant: H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (NaClO_4), $[\text{CuL}^3] = 9,07 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$.

Sur le graphique, nous pouvons constater qu'entre pH 4 et 9, les mêmes variations sont obtenues, ce qui indique une certaine stabilité du complexe dans cette gamme de pH. On peut également noter la présence d'un seul pic de réduction et d'oxydation qui correspond au couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$, mais il n'y a pas de deuxième réduction, due au couple $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^0$ (située à 0 V). On peut donc affirmer qu'il n'y a pas de décomplexation du cuivre (I) par le ligand en milieu réducteur et donc pas de relargage du cuivre qui serait alors réduit en cuivre(0).

Cependant, en milieu acide (pH 2,38), cette deuxième vague d'oxydo-réduction est observée. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à pH acide, le complexe de Cu^{I} va être moins stable et plus labile ce qui va provoquer le relargage du cuivre(I). Une fois libéré, celui-ci va être réduit en cuivre(0). En milieu très basique, d'autres phénomènes semblent se produire (formations d'hydroxydes par exemple). Les différents potentiels ont pu être calculés à partir de cette expérience (Tableau 3. 6).

pH	E_{pc}	E_{pa}	$E_{1/2}$
4,3	-0,72	-0,52	-0,64
7,4	-0,76	-0,53	-0,63
9,36	-0,76	-0,5	-0,63

Tableau 3. 6: Récapitulatif des valeurs obtenues pour les potentiels d'oxydation et de réduction à différents pH, et calcul du potentiel d'oxydo-réduction du ligand (Ag/AgCl).

Les valeurs déterminées par voltampérométrie cyclique nous permettent de calculer la valeur de $E_{1/2}$. La relation utilisée pour le calcul du potentiel est : $E_{1/2} = (E_{\text{pc}} + E_{\text{pa}})/2$.

Afin de vérifier que nous sommes bien en présence d'un système quasi-réversible, comme semble l'indiquer l'allure des courbes, plusieurs paramètres ont été déterminés. Des voltampérogrammes à pH fixe et à vitesse de balayage variable ont été effectués (Figure 3. 36).

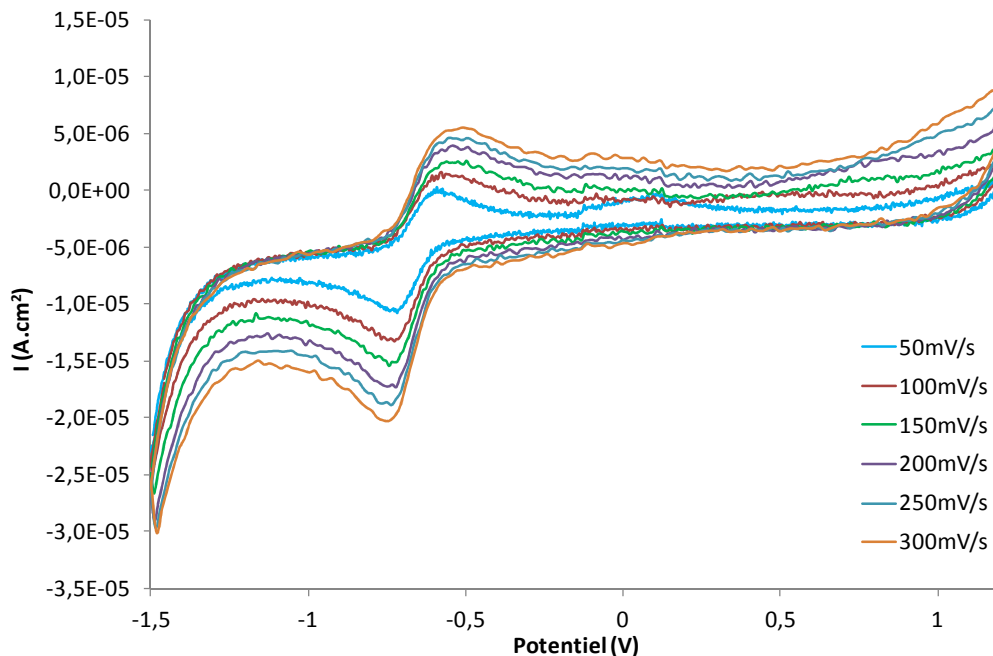


Figure 3. 36: Voltampérogrammes enregistrés pour le complexe CuL³ à pH 7,34, en mode interactif ($v = 50, 100, 150, 200, 250$ et $300 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$). Solvant : H₂O, I = 0,1 M (NaClO₄), [CuL³] = $9,07 \times 10^{-4}$ M, T = 25,0(2) °C.

Si l'on compare les potentiels E_{pc} et E_{pa} aux différentes vitesses, nous remarquons que ceux-ci sont quasiment constants. Les potentiels ne sont pas dépendants de la vitesse de balayage

Un autre critère permettant de vérifier la quasi-réversibilité de notre système est la relation i_{pc} ou $i_{pa} = f(v^{1/2})$. Pour le ligand L³, une variation linéaire est observée à pH 7,4 (Figure 3. 37).

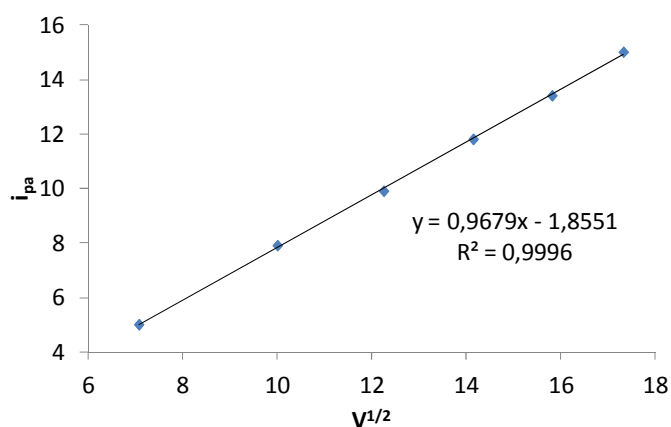


Figure 3. 37: Influence de la vitesse de balayage sur i_{pa} , à pH 7,4. Solvant : H₂O, I = 0,1 M (NaClO₄), [CuL³] = $9,07 \times 10^{-4}$ M, T = 25,0(2) °C.

Cette linéarité démontre bien la quasi-réversibilité de notre système.

Ces résultats ont été confirmés par des mesures en voltampérométrie à ondes carrées (Figure 3. 38).

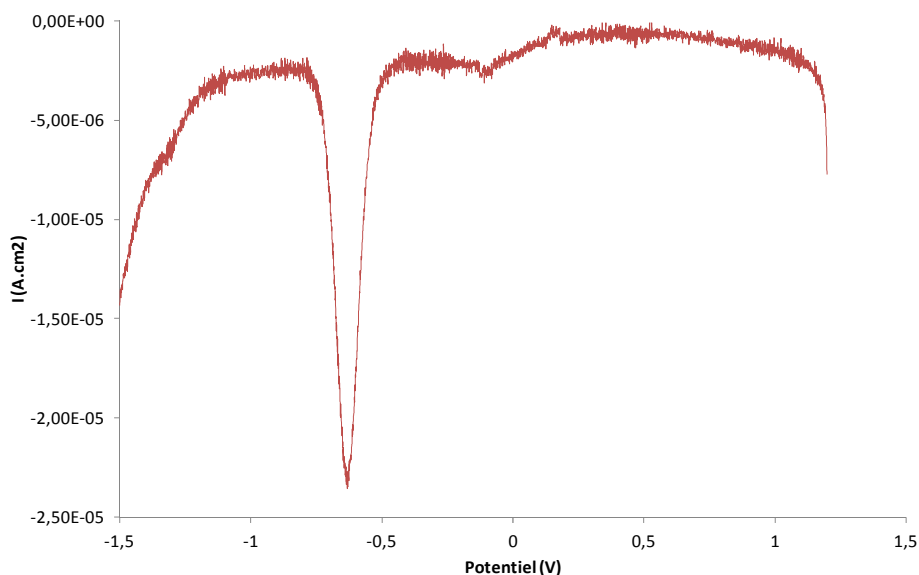


Figure 3. 38: Voltampérométrie à ondes carrées du complexe CuL^3 à pH 7,4 (vitesse de balayage $v = 200 \text{ mV/s}$. Solvant: H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (NaClO_4), $[\text{CuL}^3] = 9,07 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$.

La valeur du potentiel redox obtenue pour CuL^3 peut être comparée avec celles des ligands biologiques (exemples : NADPH, GSH, FADH, pyruvate...) (Tableau 3. 5). A $-0,63 \text{ V}$ (AgCl/Ag), soit $-0,43 \text{ V}$ (ENH), nous sommes hors d'atteinte de ces réducteurs, ce qui devrait éviter les processus de réduction, de démétallation ou de dismutation en milieu physiologique.

D'autre part, grâce à la voltampérométrie à ondes carrées, il est possible de déterminer le nombre d'électrons échangés durant le processus redox (Equation 3. 6).

$$L^{1/2} = 3,52RT/nF \quad \text{avec } L^{1/2} = \text{largeur à mi-hauteur}$$

Equation 3. 6: Relation entre la largeur à mi-hauteur du pic et le nombre d'électrons échangés.

Le nombre d'électrons échangés dans notre cas est de 1. Cela est en accord avec notre système puisque qu'il n'y a qu'un couple redox en jeu, $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$.

Le ligand L^3 présente donc des caractéristiques intéressantes pour la complexation du cuivre 64 et pour des applications en imagerie TEP. Il possède une constante de complexation élevée, une bonne sélectivité pour le cuivre(II) par rapport au zinc(II), cobalt(II) et nickel(II). Il reste stable en milieu (très) acide et présente un système quasi-réversible. Le potentiel d'oxydo-réduction est en dessous de $-0,4 \text{ V}$ et le complexe $[\text{CuL}^3]$ ne devrait donc pas être réduit par les réducteurs biologiques présents dans le corps humain.

iii. **Propriétés électrochimiques du complexe CuL^6**

Les propriétés électrochimiques du ligand L^6 ont également été étudiées afin de pouvoir faire la comparaison avec le ligand L^3 (Figure 3. 39).

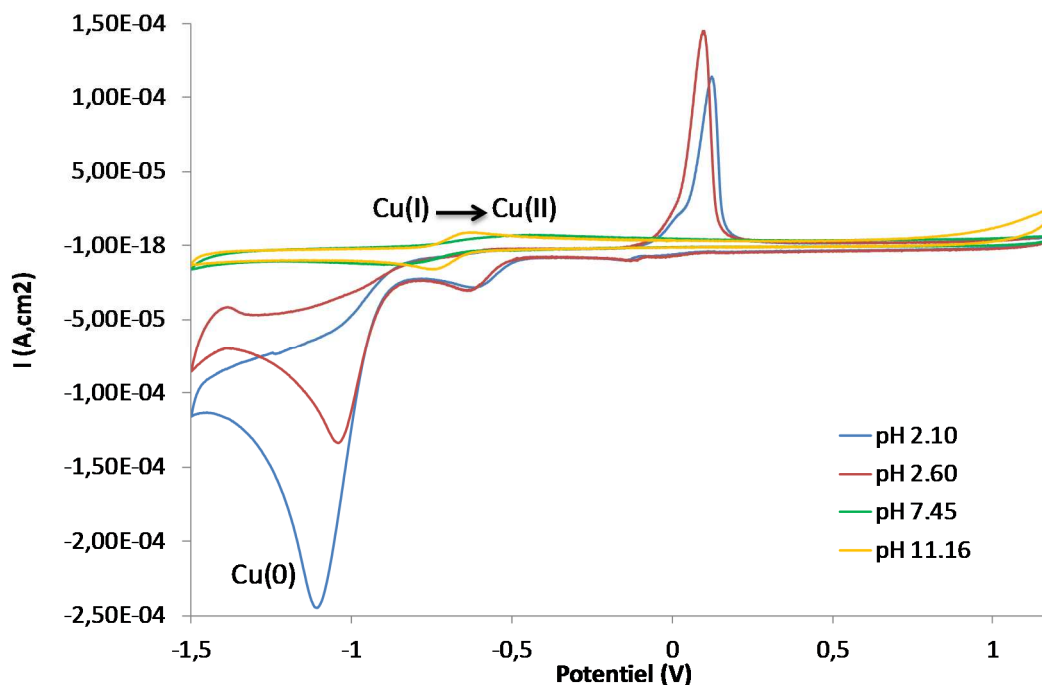


Figure 3. 39: Voltampérogrammes cycliques de solutions de CuL^6 à différentes valeurs de pH ($\nu = 200 \text{ mV/s}$).
Solvant: H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (NaClO_4), $[\text{CuL}^3] = 8,90 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$.

On peut constater, d'après les balayages en voltampérométrie cyclique, que l'on retrouve un comportement similaire du ligand L^6 par rapport au ligand L^3 . En effet, à pH neutre (7,4) le signal caractéristique d'un système quasi-réversible est présent. A pH basique il n'y a pas de pics supplémentaires (pas de formation d'hydroxydes) ; par contre à pH acide, on retrouve le pic d'oxydo-réduction attribué au couple Cu^1/Cu^0 , signe de la décomplexation du cuivre.

Le comportement du complexe en fonction des vitesses de balayage, à pH fixe, a confirmé cette quasi-réversibilité du système (Figure 3. 40).

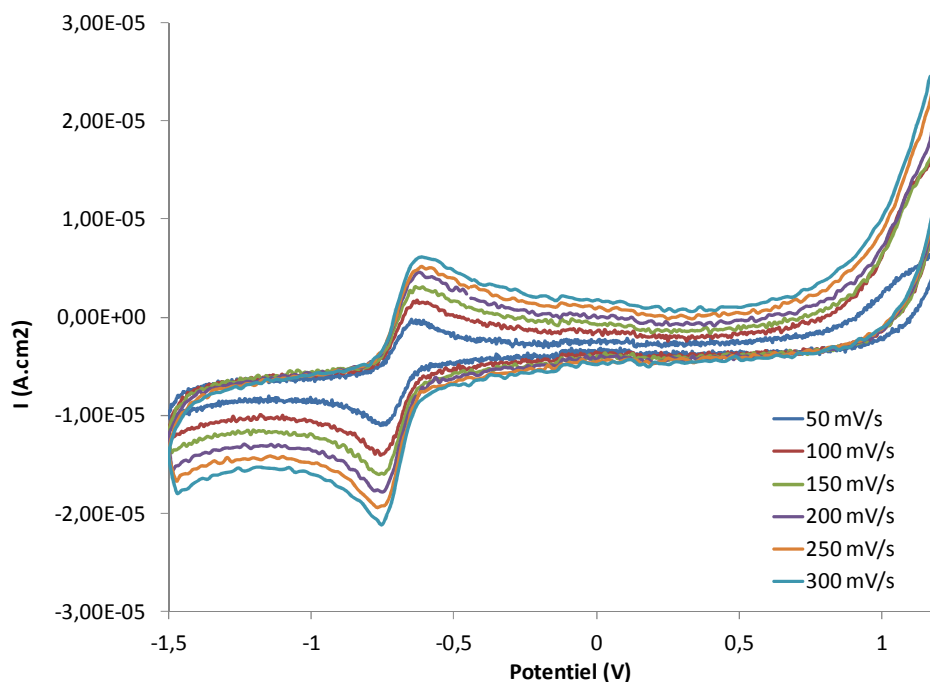


Figure 3. 40: Voltampérogrammes enregistrés pour le complexe de cuivre(II) formé avec le ligand L^6 à pH 11,16, en mode interactif ($v = 50, 100, 150, 200, 250$ et $300 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$). Solvant: H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (NaClO_4), $[\text{CuL}^3] = 8,90 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$.

De même que pour le ligand précédent, un voltampérogramme à ondes carrées a été réalisé afin de confirmer la valeur du potentiel d'oxydo-réduction (Figure 3. 41).

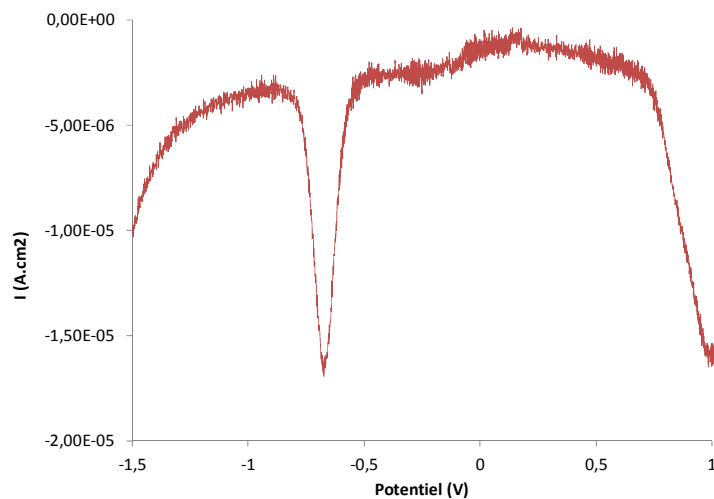


Figure 3. 41 : Voltampérogramme à ondes carrées du complexe CuL^6 à pH 11,16 (vitesse de balayage $v = 200 \text{ mV/s}$. Solvant: H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (NaClO_4), $[\text{CuL}^3] = 8,90 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$.

Le potentiel d'oxydo-réduction déterminé pour le complexe CuL^6 est donc de $-0,68 \text{ V}$ (AgCl/Ag). Il est donc du même ordre que pour CuL^3 .

3. Conclusion

Pour conclure sur ces études électrochimiques, nous pouvons dire que les deux ligands ont un comportement similaire. Ceci est un résultat logique car il n'y a qu'une légère différence entre

les deux structures (un acide carboxylique au lieu d'un alcool primaire). On peut donc supposer que la complexation du cuivre(II) par L^6 sera similaire au niveau des constantes d'affinité et des cinétiques de complexation et de décomplexation.

Pour conclure, les complexes de cuivre(II) CuL^3 et CuL^6 ont montré une bonne stabilité en milieu réducteur puisqu'ils présentent un système quasi-réversible qui témoigne de la complexation assez forte du cuivre(I) par nos ligands. La valeur de potentiel du couple $Cu(II)/Cu(I)$ pour le complexe CuL^3 est assez basse et est du même ordre de grandeur que celle d'autres chélatants du cuivre(II) décrits dans la littérature (no1pa2py et H_2L2 par exemple). De plus, la stabilité thermodynamique, la sélectivité ainsi que l'inertie du complexe CuL^3 sont bonnes. On constate en effet, que par rapport à ses concurrents de la littérature, notre complexe de $Cu(II)$ possède le meilleur équilibre entre les propriétés requises (stabilité, sélectivité, inertie, potentiel redox) ce qui en fait un bon compétiteur dans le cadre de l'imagerie TEP (Tableau 3. 5).

Les études structurales ont montré l'obtention d'une cage adaptée à l'accueil du métal ciblé. Une nouvelle fois, il a été démontré la forte rigidité du squelette bispidone, grâce aux études RMN montrant peu de changements au niveau des déplacements chimiques, excepté au niveau des atomes impliqués dans la complexation du métal.

Les études physico-chimiques ont donné des résultats très satisfaisants, puisque le ligand L^3 présente toutes les caractéristiques thermodynamiques et cinétiques requises pour l'obtention d'un bon chélatant dans le cadre de l'imagerie TEP. L'introduction d'une fonction acide carboxylique semble donc être un bon choix pour l'obtention de complexes bispidine-cuivre(II) stables. Des études supplémentaires, notamment l'insertion d'une fonction de couplage, ont été réalisées et sont présentées dans la partie suivante (chap. IV).

¹ Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Chimie Organique. Editions De Boeck Université* **2001**, 284.

² Coelho, A. C.; Gomes, A. C.; Fernandes, J. A.; Paz, F. A. A.; Braga, S. S.; Rino, L.; Pereira, L.; Pillinger, M.; Gonçalves, I. S. Crystal Structure and Spectroscopic Studies of a Dimeric Europium(III) B-Diketonate Complex Containing [3-(2-Pyridyl)-1-Pyrazolyl]acetate. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 2014, 1284–1288.

³ Born, K.; Comba, P.; Ferrari, R.; Lawrance, G. A.; Wadepohl, H. Stability Constants: A New Twist in Transition Metal Bispidine Chemistry. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 458–464.

⁴ Comba, P.; Lopez de Laorden, C.; Pritzkow, H. Tuning the Properties of Copper (II) Complexes with Tetra- and Pentadentate Bispidine (= 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonane) Ligands. *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88, 647–664.

⁵ Shannon, R. t. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallogr. A* **1976**, 32, 751–767.

⁶ Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. Hexadentate Bispidine Derivatives as Versatile Bifunctional Chelate Agents for Copper(II) Radioisotopes. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 347–359.

⁷ Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. HYPERQUAD2000; Leeds, UK, and Florence, Italy, **2000**.

⁸ Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of Equilibria in Solution. Determination of Equilibrium Constants with the HYPERQUAD Suite of Programs. *Talanta* **1996**, 43, 1739–1753.

⁹ Moulinet d'Hardemare, A. du; Gellon, G.; Philouze, C.; Serratrice, G. Oxinobactin and Sulfoxinobactin, Abiotic Siderophore Analogues to Enterobactin Involving 8-Hydroxyquinoline Subunits: Thermodynamic and Structural Studies. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 12142–12151.

¹⁰ Coppens, G.; Gillet, C.; Nasielski, J.; Donck, E. V. Propriétés Physico-Chimiques de Composés À Caractère aromatique—IV: Influence de La Polarité Des Solvants Sur Les Transitions N-V et N- π^* de Quelques Dérivés Monoaza-Aromatiques. *Spectrochim. Acta* **1962**, 18, 1441–1453.

¹¹ Gottarelli, G.; Samori, B. The Optical Activity of the Pyridine Chromophore. *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11, 2055–2058.

¹² Specfit, Version 1-2, Spectrum Software Associates, Chapel Hill, NC-USA, **1996**.

¹³ Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic data—III Model-Free Analysis of Spectrophotometric and ESR Titrations. *Talanta* **1985**, 32, 1133–1139.

¹⁴ Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. Hyperquad Simulation and Speciation (HySS): A Utility Program for the Investigation of Equilibria Involving Soluble and Partially Soluble Species. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311–318.

- ¹⁵ Bleiholder, C.; Börzel, H.; Comba, P.; Ferrari, R.; Heydt, M.; Kerscher, M.; Kuwata, S.; Laurency, G.; Lawrance, G. A.; Lienke, A.; et al. Coordination Chemistry of a New Rigid, Hexadentate Bispidine-Based Bis (amine) Tetrakis (pyridine) Ligand. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8145–8155.
- ¹⁶ Siener, T.; Cambareri, A.; Kuhl, U.; Englberger, W.; Haurand, M.; Kögel, B.; Holzgrabe, U. Synthesis and Opioid Receptor Affinity of a Series of 2, 4-Diaryl-Substituted 3, 7-Diazabicyclononanones. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3746–3751.
- ¹⁷ Kuhl, U.; Englberger, W.; Haurand, M.; Holzgrabe, U. Diazabicyclo [3.3. 1] Nonanone-Type Ligands for the Opioid Receptors. *Arch. Pharm.* **2000**, *333*, 226–230.
- ¹⁸ Hosken, G. D.; Hancock, R. D. Very Strong and Selective Complexation of Small Metal Ions by a Highly Preorganised Open-Chain Bispidine-Based Ligand. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1994**, 1363.
- ¹⁹ Motekaitis, R. J.; Rogers, B. E.; Reichert, D. E.; Martell, A. E.; Welch, M. J. Stability and Structure of Activated Macrocycles. Ligands with Biological Applications. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 3821–3827.
- ²⁰ Łomozik, L. Complex Compounds of Cu(II) and Zn(II) with N,N-Dimethylglycine and N,N-Diethylglycine in Water and in water—Methanol System. *Monatshefte für Chemie Chemical Monthly* **1984**, *115*, 261–270.
- ²¹ Fischer, A.; King, M. J.; Robinson, F. P. Inductive Substituent Constants from Dissociation of Methyl-Substituted 2-Picolinium Ions. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 3059–3067.
- ²² Abada, S.; Lecointre, A.; Déchamps-Olivier, I.; Platas-Iglesias, C.; Christine, C.; Elhabiri, M.; Charbonniere, L. Highly Stable Acyclic Bifunctional Chelator for ⁶⁴Cu PET Imaging. *Radiochim. Acta* **2011**, *99*, 663–678.
- ²³ Irving, H.; Williams, R. J. P. 637. The Stability of Transition-Metal Complexes. *J. Chem. Soc.* **1953**, 3192–3210.
- ²⁴ Brooker, C. Le corps humain: Étude, structure et fonction. *De Boeck Supérieur*, **2001**.
- ²⁵ McCarthy, D. W.; Shefer, R. E.; Klinkowstein, R. E.; Bass, L. A.; Margeneau, W. H.; Cutler, C. S.; Anderson, C. J.; Welch, M. J. Efficient Production of High Specific Activity ⁶⁴Cu Using a Biomedical Cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 35–43.
- ²⁶ Watanabe, S.; Watanabe, S.; Liang, J.; Hanaoka, H.; Endo, K.; Ishioka, N. S. Chelating Ion-Exchange Methods for the Preparation of No-Carrier-Added ⁶⁴Cu. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36*, 587–590.
- ²⁷ Hathaway, B.; Billing, D. E. The Electronic Properties and Stereochemistry of Mono-Nuclear Complexes of the Copper (II) Ion. *Coord. Chem. Rev.* **1970**, *5*, 143–207.
- ²⁸ Raymond, K. N.; Carrano, C. J. Coordination Chemistry and Microbial Iron Transport. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 183–190.
- ²⁹ Roger, M.; Lima, L. M. P.; Frindel, M.; Platas-Iglesias, C.; Gustin, J.-F.; Delgado, R.; Patinec, V.; Tripier, R. Monopicolinate-Dipicolyl Derivative of Triazacyclononane for Stable Complexation of Cu²⁺ and ⁶⁴Cu²⁺. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5246–5259.

- ³⁰ Esteves, C. V.; Lamosa, P.; Delgado, R.; Costa, J.; Désogère, P.; Rousselin, Y.; Goze, C.; Denat, F. Remarkable Inertness of Copper(II) Chelates of Cyclen-Based Macrobicycles with Two *trans* - *N* -Acetate Arms. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5138–5153.
- ³¹ Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 4829–4833.
- ³² Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858–2902.
- ³³ Lima, L. M. P.; Esteban-Gómez, D.; Delgado, R.; Platas-Iglesias, C.; Tripier, R. Monopicolinate Cyclen and Cyclam Derivatives for Stable Copper(II) Complexation. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 6916–6927.
- ³⁴ Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Hill, D. C.; Reed, D. P.; Rogers, M. E.; Condon, J. S.; Fagan, M. A.; Calabrese, J. C.; Lam, K.-C.; Guzei, I. A.; et al. Synthesis and Characterization of Cross-Bridged Cyclams and Pendant-Armed Derivatives and Structural Studies of Their Copper(II) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10561–10572.
- ³⁵ Smith, S. V. Molecular Imaging with Copper-64. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1874–1901.
- ³⁶ Clark, W. M. Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems Williams and Wilkins, Baltimore (1960)(b). *Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements*, 12 Marcel Dekker, New York **1976**.
- ³⁷ Krebs, H. A.; Kornberg, H. L.; Burton, K. *Energy Transformations in Living Matter: A Survey*; Springer, 1957.
- ³⁸ Randles, J. E. B. Trans Faraday Soc. *Trans. Faraday Soc.* **1948**, *44*, 327.
- ³⁹ Ševčík, A. Oscillographic Polarography with Periodical Triangular Voltage. *Collec. Czech. Chem. C.* **1948**, *13*, 349–377.

Chapitre IV :
Fonctionnalisation des
bispidines et couplage

1. Fonctionnalisation par couplage peptidique sur le ligand L⁵

La première stratégie de fonctionnalisation ayant été explorée consiste à utiliser la fonction acide carboxylique en position R₂. Le ligand L⁵ a été utilisé comme modèle puisqu'il ne possède qu'une seule fonction réactive.

Le couplage peptidique a d'abord été réalisé avec la propylamine dans des conditions classiques (DCC, HOBt) avant d'essayer d'introduire une chaîne possédant également une fonction réactive amine protégée.¹ La synthèse suivante a été réalisée (Schéma 4. 1).

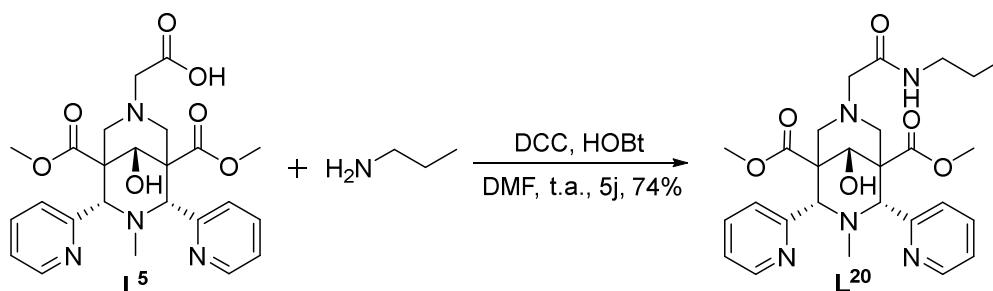
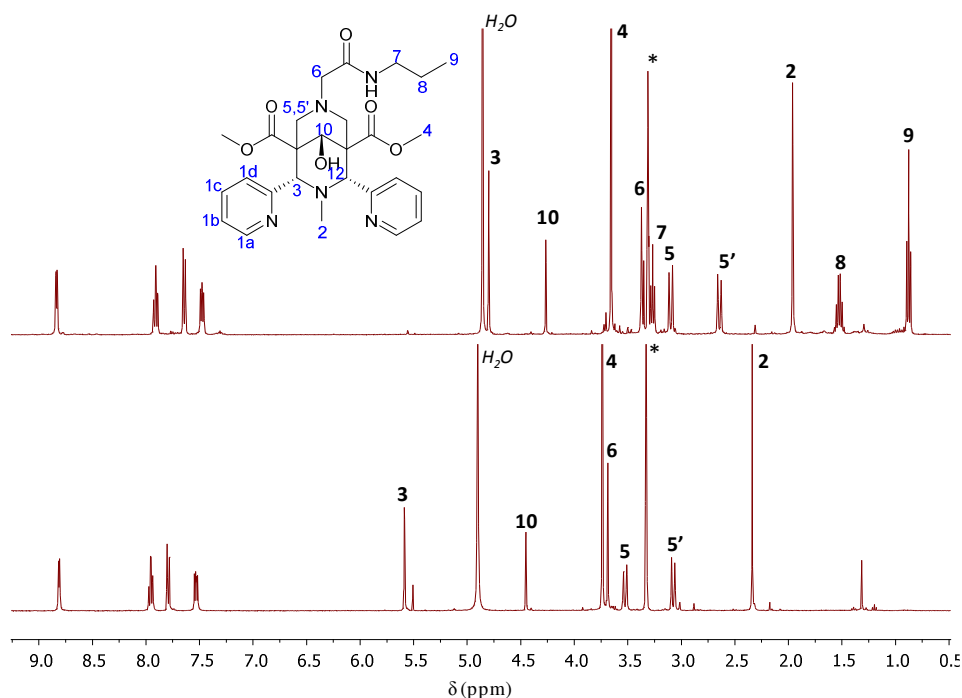


Schéma 4. 1: Schéma réactionnel du couplage peptidique de la propylamine sur le ligand L⁵.

La RMN ¹H du produit après purification montre que le couplage s'effectue bien, au vu des nouveaux signaux (H₇, H₈ et H₉) et des déplacements chimiques de certains protons (H₃, H₅ et H₆) (Figure 4. 1).



Cet essai avec la propylamine montre qu'il est donc possible d'insérer un espaceur en position R₂. Le ligand L⁵ a ensuite été couplé avec une diamine monoprotégée, la 3-[N-tert-butoxycarbonylamino]propylamine,² dans le but d'introduire une fonction de greffage (Figure 4. 2).

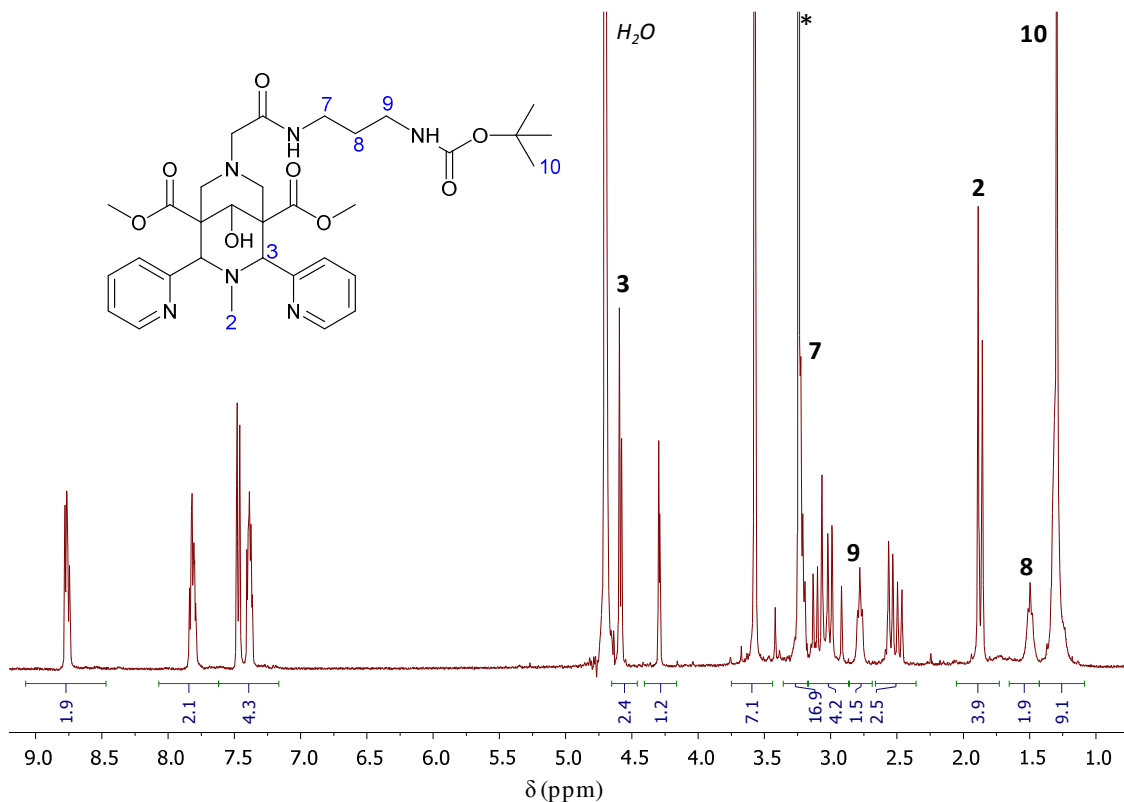


Figure 4. 2 : RMN ¹H du ligand L²¹ (400 MHz, *CD₃OD).

Le spectre RMN du proton indique bien la présence des protons H₇, H₈ H₉ et H₁₀ correspondants à la chaîne introduite, ainsi que le blindage des protons H₃, H_{1d} et H_{1c}. Cette synthèse a été effectuée dans les mêmes conditions que la précédente mais le rendement est beaucoup moins élevé dans ce cas (48% contre 74%). L'explication la plus plausible serait que la réactivité est diminuée du fait de l'encombrement stérique induit par la présence du groupement protecteur Boc. De plus, sur le spectre RMN, nous pouvons également constater la présence de deux formes différentes, qui peuvent être dues à la possible rotation au niveau de la liaison amide.^{3,4,5}

Au vu de ces résultats, cette voie de fonctionnalisation a été abandonnée, d'autant plus que cette voie de synthèse présente l'inconvénient de modifier un groupement coordinant, l'acide carboxylique, au profit de l'amide, ce qui peut entraîner une diminution de la constante de complexation pour le cuivre(II).

2. Chélatant BiFonctionnel dérivé de la lysine

a) Synthèse

Une nouvelle voie de synthèse a donc été explorée. Suite à l'introduction possible d'un motif glycine en R₂ pour le ligand L⁴, il a été décidé d'introduire un autre acide aminé possédant une chaîne latérale avec une fonction réactive. Notre choix s'est porté sur la lysine qui présente une amine primaire sur sa chaîne latérale ainsi que quatre atomes de carbone qui serviront d'espaceur. La synthèse de ce nouveau ligand a été effectuée en utilisant des conditions expérimentales analogues à celles mises au point pour la synthèse du ligand L⁴ (chap. II) (Schéma 4. 2).

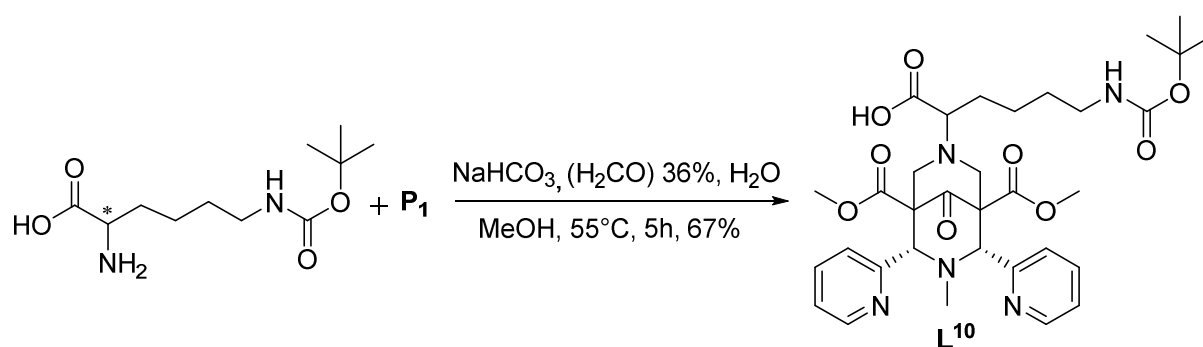


Schéma 4. 2: Synthèse du ligand L¹⁰.

Contrairement aux ligands L¹, L⁴ et L⁷, le produit n'a pas pu être cristallisé dans les différents solvants testés. Le ligand a été obtenu pur après plusieurs précipitations dans le diéther. La RMN ¹H montre que l'on obtient une espèce dissymétrique (due à l'atome de carbone chiral introduit par la lysine (configuration L)), et que celle-ci possède une conformation chaise-chaise avec les motifs pyridines en configuration *cis* (Figure 4. 3). Nous remarquons également la présence de deux systèmes AB pour les protons H_{5,5'}, due à la différence d'environnement chimique entre les protons en position axiale et ceux en position équatoriale, ainsi qu'à la présence du carbone chiral.

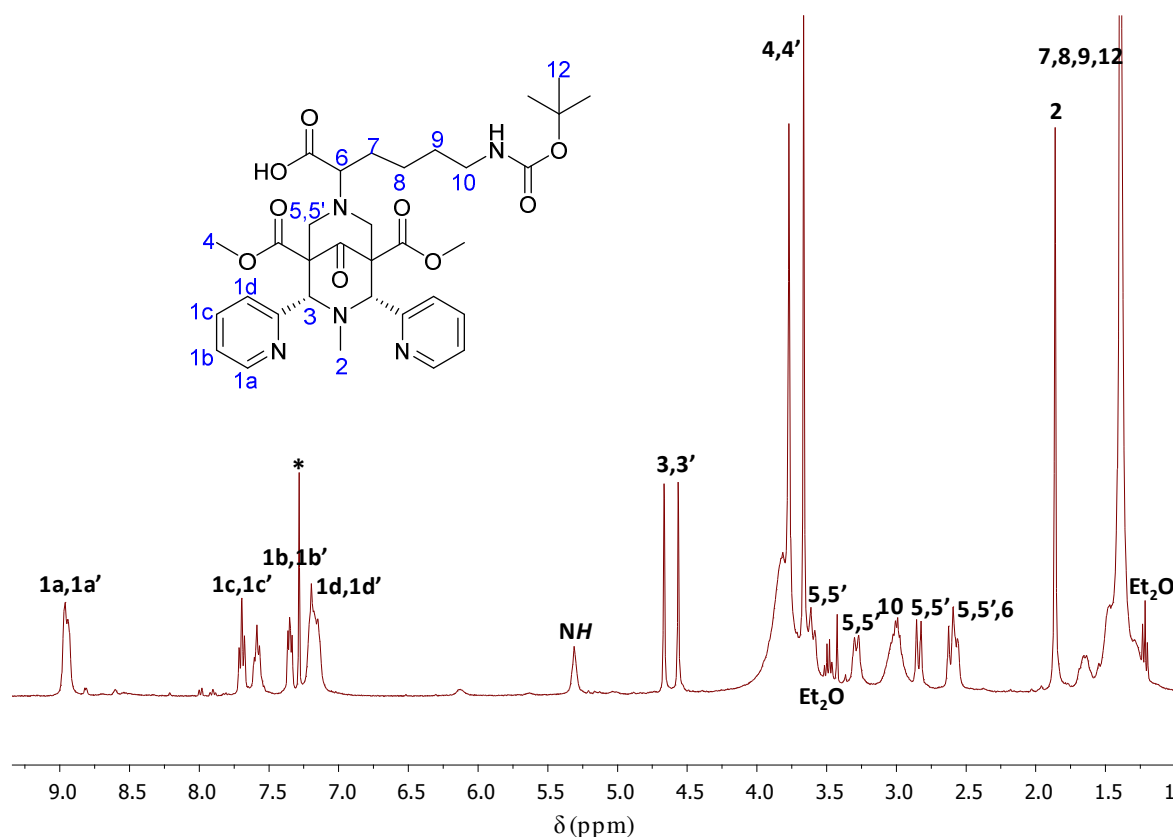


Figure 4. 3: Spectre RMN ^1H du ligand L^{10} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$).

Le produit obtenu a également été mis en évidence par spectrométrie de masse ($m/z = 654,31$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Une fois le ligand obtenu, celui-ci a été réduit selon les conditions optimisées décrites dans le chapitre II (Schéma 4. 3).

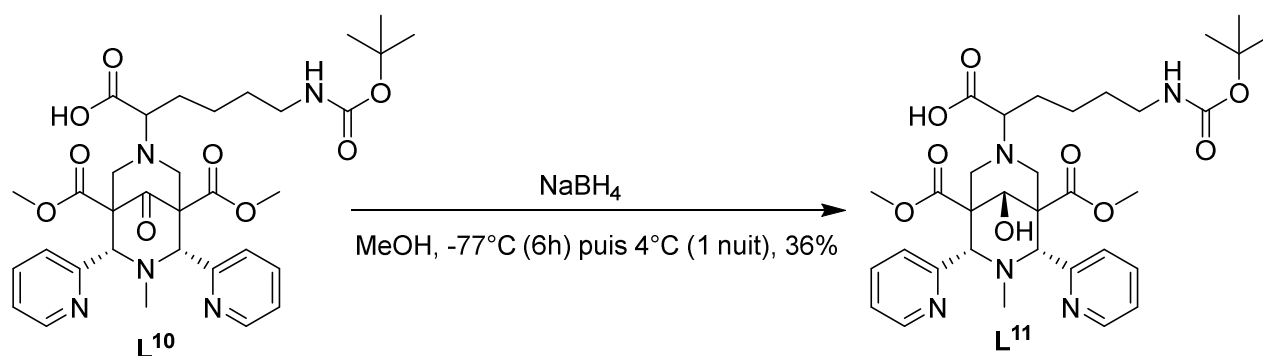


Schéma 4. 3: Réduction du ligand L^{10} par NaBH_4 .

Le ligand étant beaucoup plus stable une fois réduit, celui-ci est isolé grâce à une purification sur colonne chromatographique en phase inverse. Le rendement obtenu de 36% reste correct au vu de la séparation difficile sur colonne chromatographique (FPLC).

Le ligand L^{11} a été entièrement caractérisé par RMN (1D et 2D) (Figure 4. 4, Figure 4. 5, Figure 4. 6) et la configuration de l'alcool tertiaire a pu être déterminée.

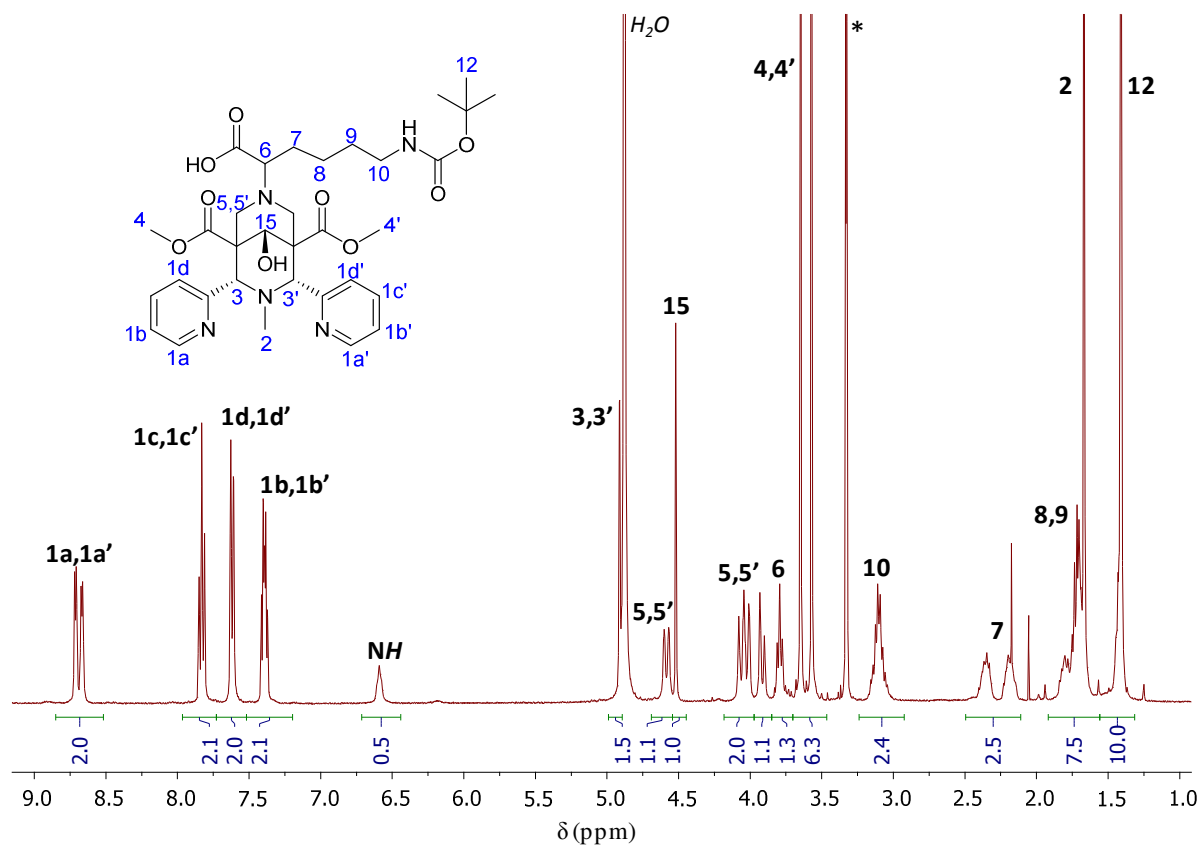


Figure 4. 4: Spectre ^1H du ligand L^{11} (400 MHz, $^*\text{CD}_3\text{OD}$).

La configuration du groupement hydroxyle semble être identique à celle des autres ligands, c'est-à-dire que le groupement pointe du côté des protons H_3 (du côté du N-Me). L'encombrement stérique généré par la présence de la chaîne latérale de la lysine ne semble donc pas avoir d'effet sur la stéréochimie obtenue après l'étape de réduction. En effet, le spectre NOESY montre bien un couplage entre $\text{H}_{5/5'}$ et H_{10} ce qui indique la présence du proton H_{10} du côté du R_2 (Figure 4. 5).

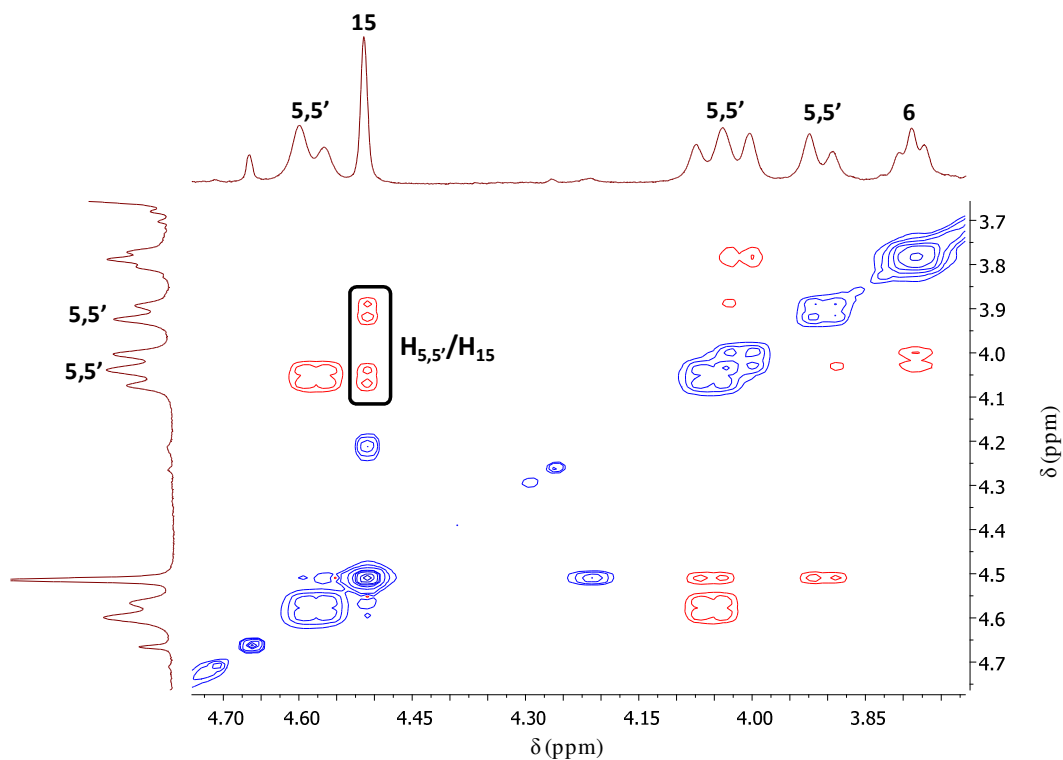


Figure 4. 5: Agrandissement du spectre RMN NOESY du ligand L^{11} (400 MHz, CD_3OD).

D'autre part, sur le spectre COSY est observé un couplage faible entre $H_{3/3'}$ et H_{15} (Figure 4. 6).

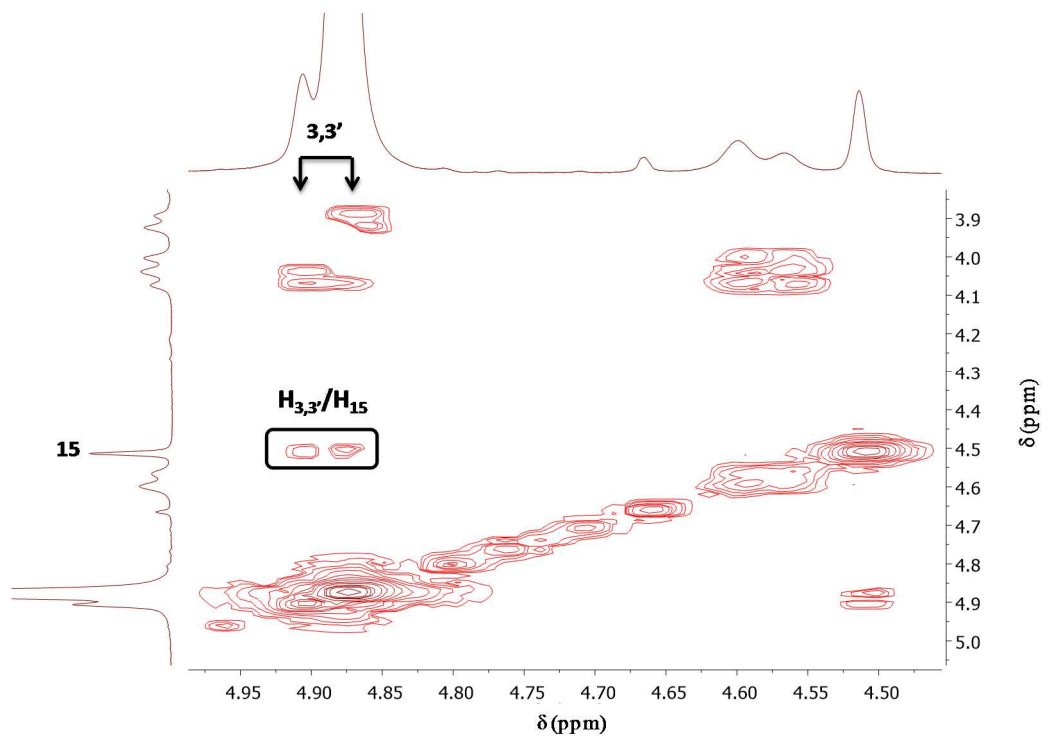


Figure 4. 6: Agrandissement du spectre RMN COSY du ligand L^{11} (400 MHz, CD_3OD).

Ce couplage entre les protons $H_{3/3'}$ et H_{15} est observé bien que nous ne soyons pas en présence d'une conformation dite en « W ». ⁶ Le couplage 4J longue distance pourrait être dû à la conformation de la molécule qui serait favorisée par des interactions intramoléculaires (liaisons hydrogènes, interaction avec le groupement protecteur Boc...). Des essais de cristallisation ont été tentés mais aucune structure n'a pu être obtenue. Cette structure nous aurait permis de conclure quant à la configuration exacte adoptée par le ligand L^{11} .

Le ligand L^{11} obtenu a ensuite été déprotégé au niveau de son groupement Boc afin d'obtenir le ligand L^{12} possédant une seule fonction amine réactive (Schéma 4. 4).

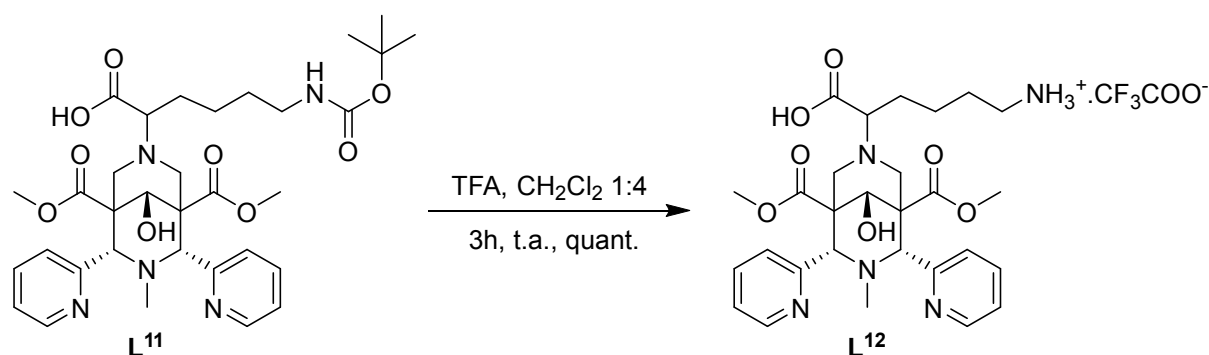


Schéma 4. 4: Déprotection du groupement Boc pour l'obtention de la fonction amine libre.

Cette étape de déprotection se fait selon des conditions classiques, en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. ⁷ Le milieu réactionnel est ensuite évaporé et le ligand obtenu (sous la forme de sel de TFA) est utilisé sans purification préalable pour l'étape suivante.

La saponification des esters méthyliques s'effectue de manière identique à celle des autres ligands. La valeur du pH est vérifiée après l'ajout d'hydroxyde de sodium (pH= 10-12). En effet, la présence de sels de TFA nécessite l'ajout d'un large excès de soude (6 éq.) afin de les neutraliser, et d'obtenir un milieu suffisamment basique pour que la saponification des esters s'effectue (Schéma 4. 5).

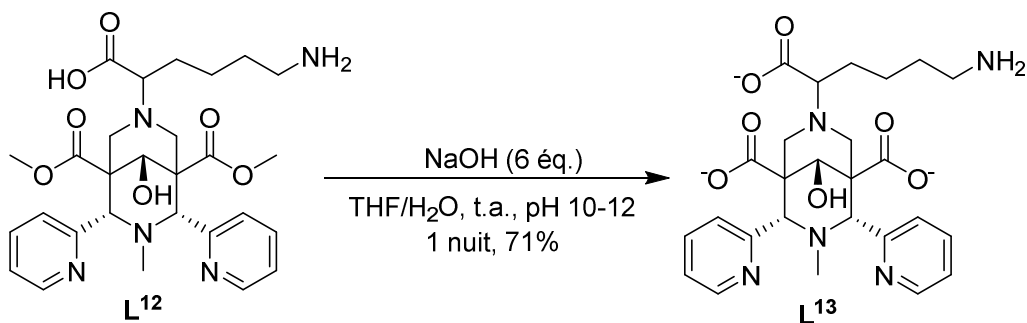
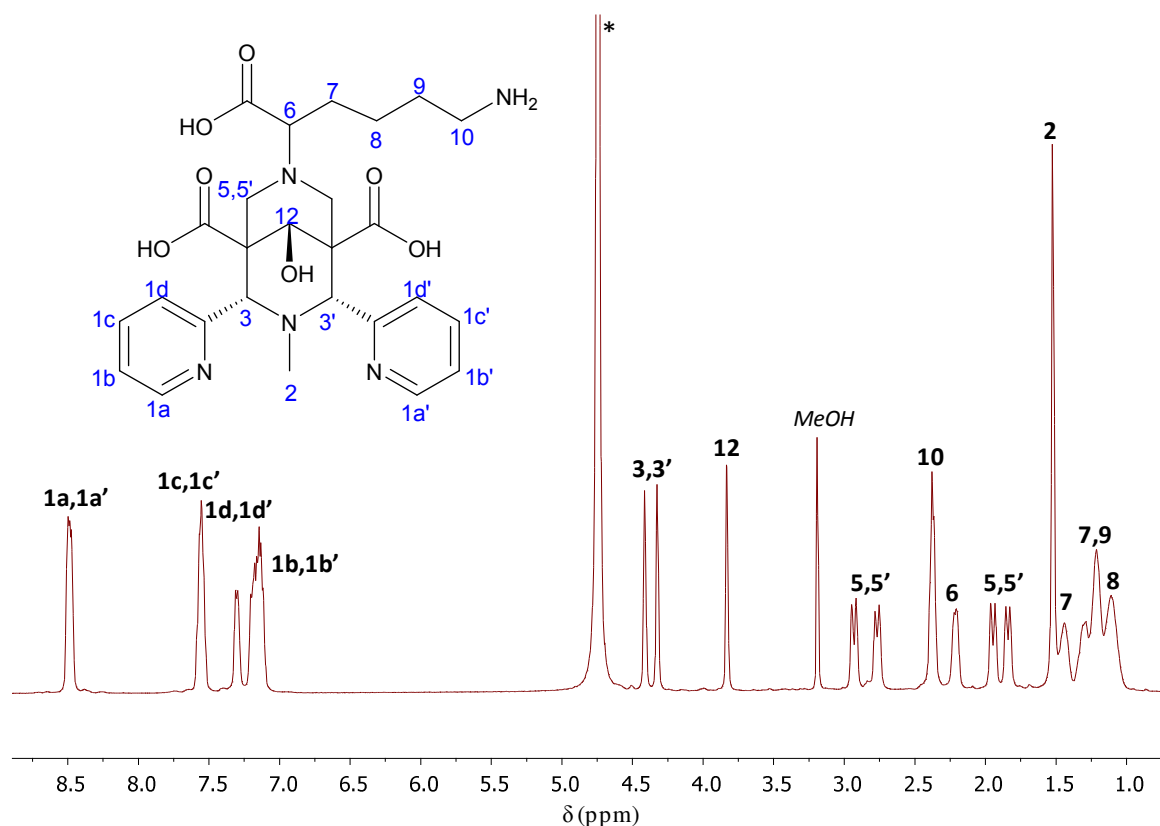


Schéma 4. 5: Saponification des esters méthyliques.

La caractérisation RMN ^1H montre la disparition des signaux correspondants aux esters méthyliques (Figure 4. 7).

Figure 4. 7: Spectre ^1H du ligand L^{13} (400 MHz, $^*\text{D}_2\text{O}$).

Le changement de solvant ainsi que la présence d'un milieu basique induit un fort déplacement des protons $\text{H}_{5,5'}$ qui se retrouvent très blindés. La spectrométrie de masse a confirmé l'obtention du produit attendu ($m/z = 528,25$, $[\text{M}+\text{H}]^+$). Le ligand ainsi obtenu est stable et soluble dans l'eau, et possède une fonction réactive pour réaliser la fonctionnalisation. L'obtention de cette fonction amine libre nous a permis d'obtenir un premier chélatant bifonctionnel, et par la suite, de coupler ce ligand à une fonction maléimide (L^{16}), un motif Bodipy (L^{14}) et à un ligand biotine (L^{15}) (chap. IV/ 3. 4. 5.).

b) Caractérisation des complexes

Le complexe de zinc(II) a été synthétisé et caractérisé par RMN (1D et 2D). Le complexe de cuivre(II) a été étudié par spectroscopie UV-Visible.

i. Etude de ZnL^{13} par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Le complexe a été obtenu par ajout de $ZnCl_2$ directement dans le solvant deutéré D_2O (Schéma 4. 6).

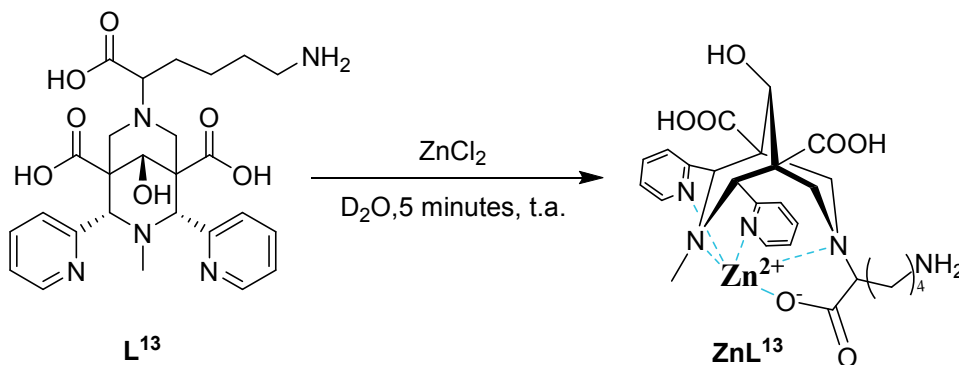


Schéma 4. 6: Complexation du zinc(II) ou du cuivre(II) par le ligand L^{13} dans D_2O .

Le complexe ZnL^{13} a montré des signaux caractéristiques des complexes de type bispidines^{8,9} (Figure 4. 8).

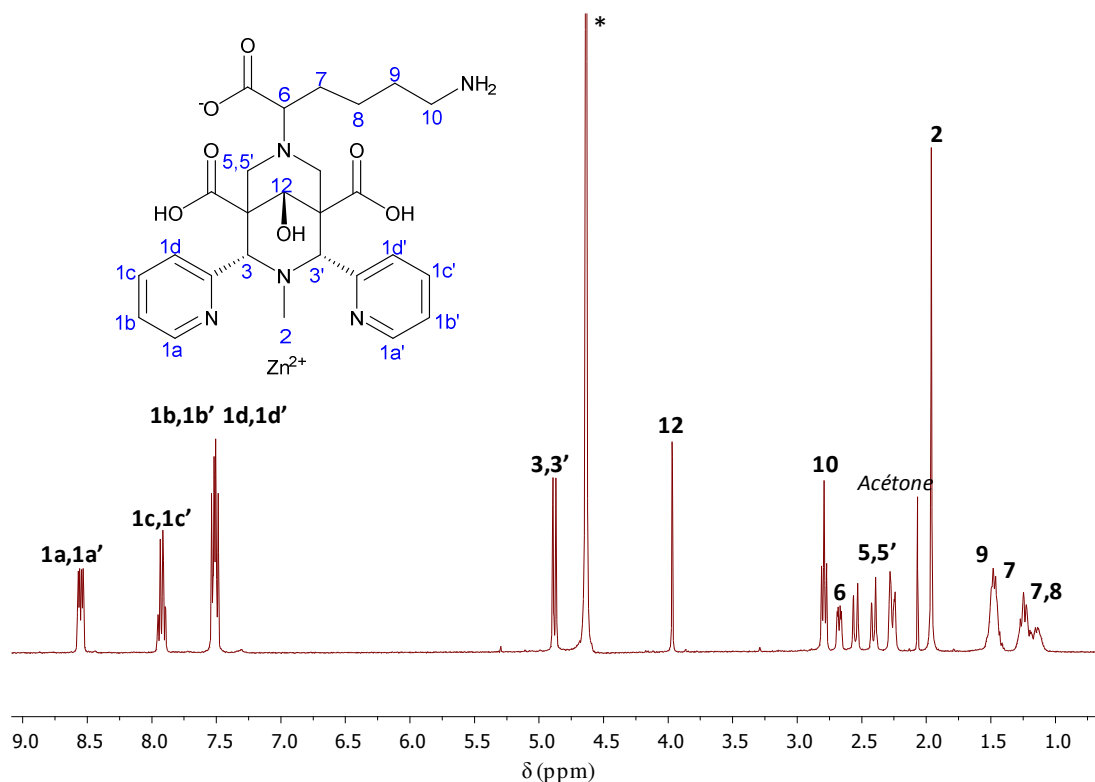


Figure 4. 8: RMN 1H du ligand L^{13} en présence d'un équivalent de $ZnCl_2$ (400 MHz, $*D_2O$).

Le spectre RMN ^1H montre l'obtention d'un motif DT(TD) dû au déblindage des protons H_{1b} , H_{1c} et H_{1d} . Cette modification s'explique par la complexation du zinc(II) qui induit la rotation des groupements pyridines. Un déblindage des protons $\text{H}_{3/3'}$ est également observé, ce qui est caractéristique de la coordination des doublets de l'azote N_3 .

La caractérisation par spectrométrie de masse a également confirmé l'obtention du complexe ($m/z = 590,16$, $[\text{M}]^+$). Des essais de cristallisation pour l'obtention d'une structure RX sont actuellement en cours.

ii. Etude de CuL^{13} par spectroscopie UV-Visible

Des dosages par spectroscopie UV-Visible ont été effectués afin de vérifier que seule une espèce 1:1 était obtenue et que la constante de complexation du cuivre(II) était du même ordre de grandeur que pour le ligand L^3 . Un titrage de L^{13} par $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ a été réalisé à pH 2 (Figure 4. 9).

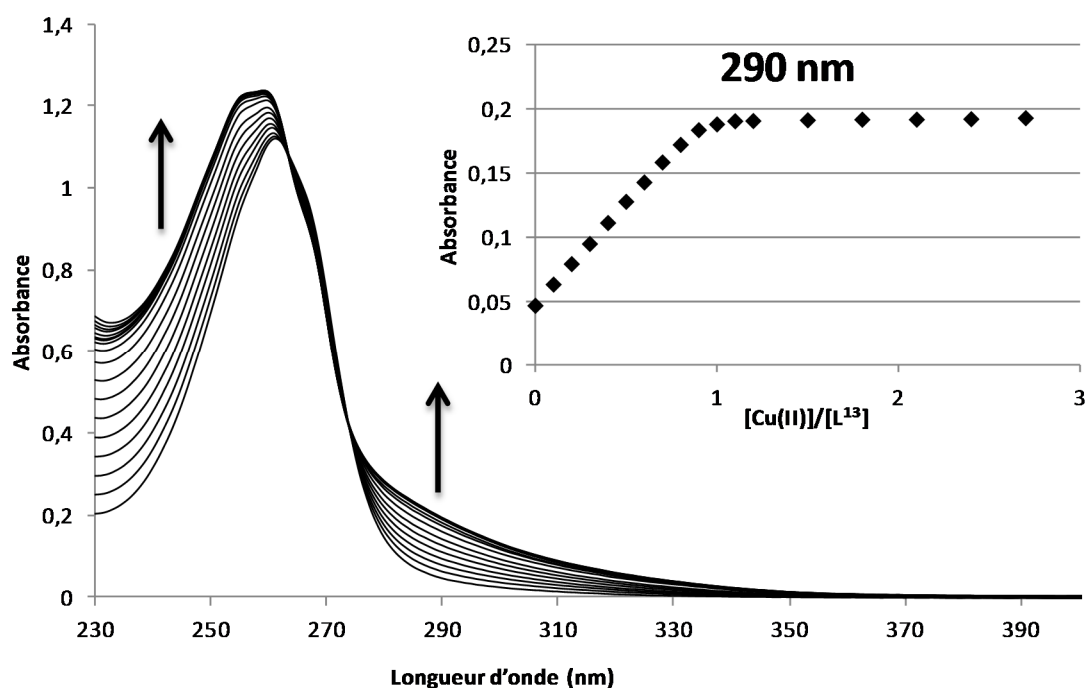


Figure 4. 9: Titrage en spectroscopie UV-Visible de L^{13} par $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ à pH 2. Solvant: $\text{HCl } 1 \times 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{L}^{13}]_i = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2]_{aj} = 0,025 \text{ M}$.

Les courbes obtenues montrent des variations non négligeables au niveau des transitions $\pi-\pi^*$ de la bande des pyridines. A 290 nm, un plateau est atteint dès l'ajout d'un équivalent de cuivre(II) par rapport au ligand, ce qui indique une complexation forte. De plus, aucune variation n'est observée après l'ajout d'un équivalent de métal, ce qui indique la formation

d'une seule espèce de stœchiométrie 1:1. De plus, la complexation du métal est rapide (< 2 minutes) comme dans le cas de L³.

L'observation des variations des bandes d-d a permis de confirmer ce résultat (Figure 4. 10).

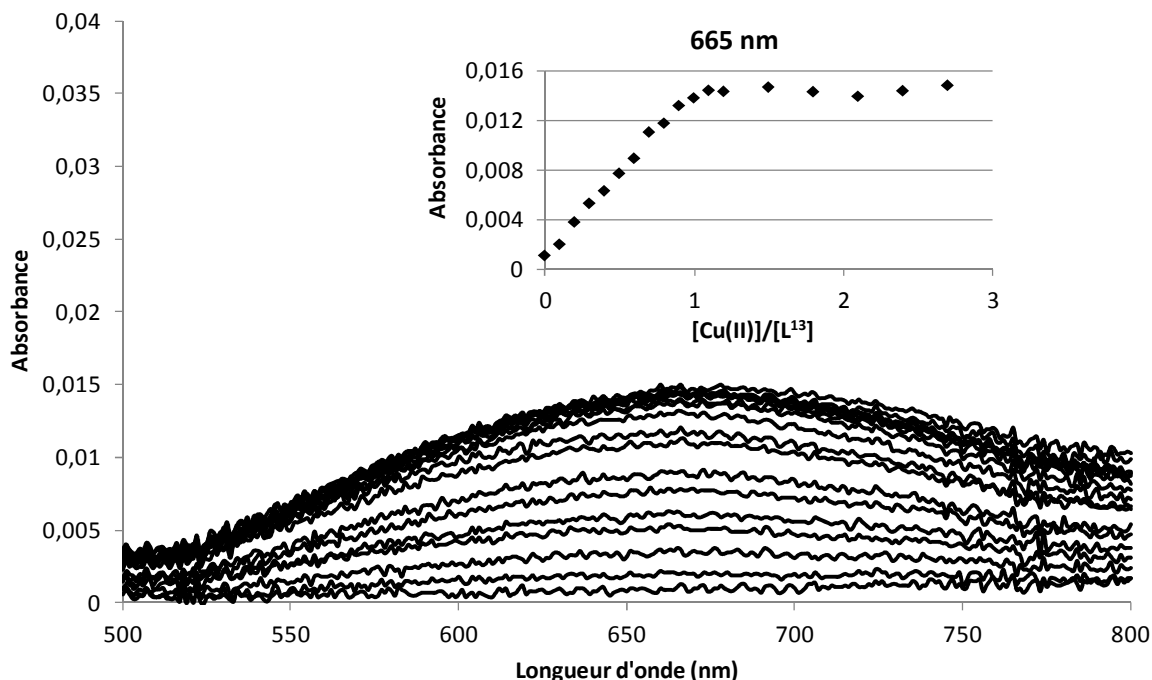


Figure 4. 10: Titrage en spectroscopie UV-Visible de L¹³ par Cu(ClO₄)₂ à pH 2. Solvant: HCl 1 x 10⁻² M, [L¹³]_i=1,0 x 10⁻⁴ M, [Cu(ClO₄)₂]_{aj}=0,025 M.

A 665 nm, les mêmes variations sont observées et indiquent donc une forte complexation 1:1. De plus, le maximum des bandes d-d se situent à 666 nm, ce qui indique une géométrie de coordination pyramidale à base carrée pour le cuivre(II)¹⁰ similaire à celle obtenue pour le ligand L³ (chap. III).

Pour conclure, les études de RMN et par spectroscopie UV-Visible ont permis de montrer que le ligand L¹³ possède le même comportement que le ligand L³ vis-à-vis de la complexation du zinc(II) et du cuivre(II). Nous pouvons donc raisonnablement penser que le ligand L¹³ sera un bon complexant du cuivre 64 dans le cadre d'applications en Tomographie par Emission de Positrons. Ce ligand a ensuite été couplé à diverses molécules afin d'obtenir d'autres chélatants bifonctionnels (CBFs).

3. Couplage au ligand Biotine

La biotine est connue pour sa très forte affinité pour la protéine streptavidine ($K_d \sim 10^{-15}$ M).¹¹ Son association avec le ligand L¹³ permettrait donc le ciblage d'anticorps streptavidinés par exemple.¹²

Dans un premier temps, la biotine-NHS a été synthétisée en une étape (Schéma 4. 7).¹³

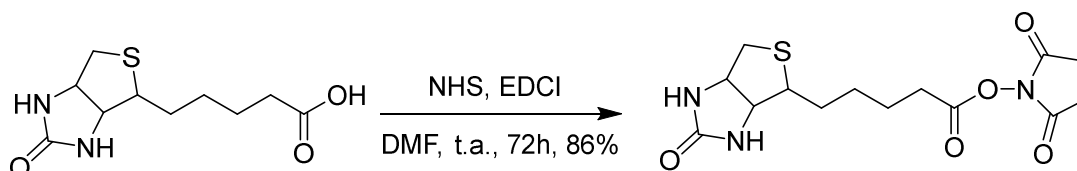


Schéma 4. 7: Synthèse de la biotine-NHS.

Cette étape nous a permis d'obtenir une fonction réactive vis-à-vis de l'amine libre du ligand L¹³. Le couplage a été réalisé dans des conditions classiques de couplage d'ester NHS,^{14,15} en présence de diisopropylamine comme base (Schéma 4. 8).

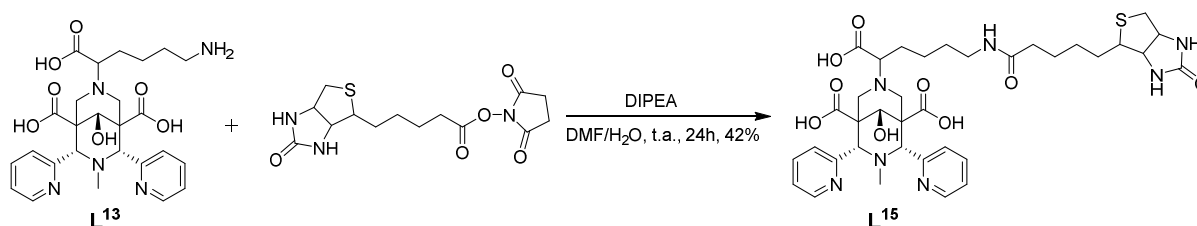


Schéma 4. 8: Synthèse du ligand L¹⁵.

Cependant, de l'eau a dû être ajoutée lors de la réaction à cause d'un problème de solubilité du ligand dans le diméthylformamide. Au vu du rendement final obtenu, la présence d'eau n'a pas empêché la réaction de se faire. L'espèce attendue a donc pu être obtenue après purification sur colonne en phase inverse (100% MeOH afin d'enlever les sels, puis 100% H₂O à 100% MeOH) et caractérisée par RMN (Figure 4. 1) et spectrométrie de masse ($m/z = 753,32$, $[M+H]^+$).

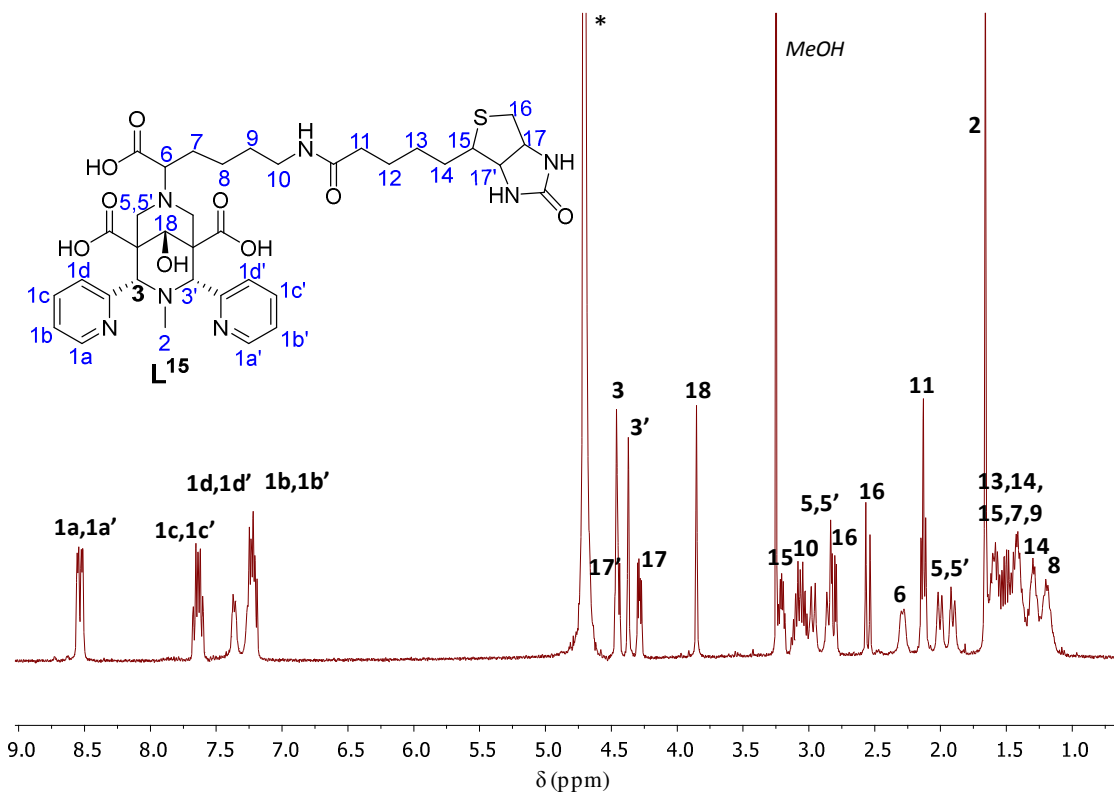


Figure 4. 11: Spectre RMN 1H du ligand L^{15} (400 MHz, $*D_2O$).

Les signaux de la biotine sont bien présents, le signal du proton H_{10} est déblindé par rapport au ligand L^{13} et sa multiplicité est modifiée, le couplage via l'ester NHS a donc bien fonctionné. Le spectre NOESY montre, une nouvelle fois, le couplage entre les protons $H_{5/5'}$ et H_{18} , ce qui confirme bien la configuration du -OH central qui pointe du côté de la position R_1 (Figure 4. 12).

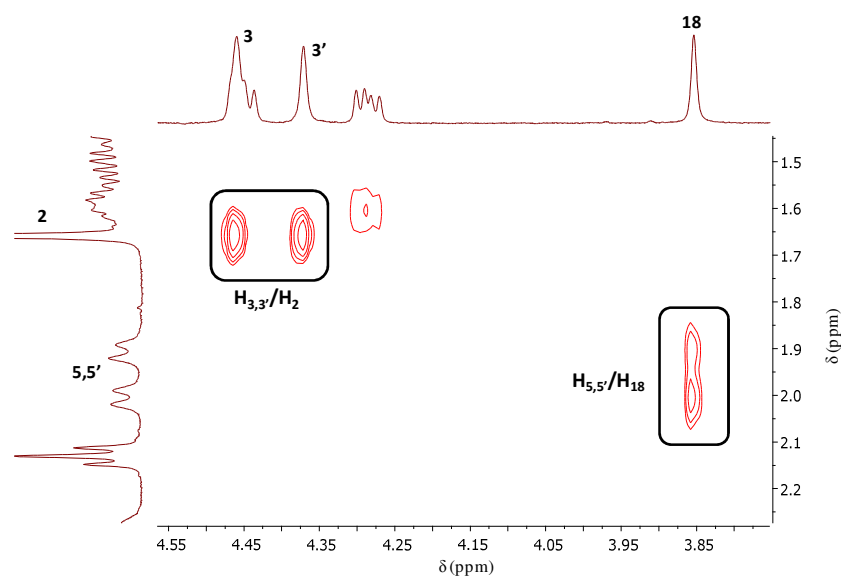


Figure 4. 12: Spectre RMN 2D NOESY (400 MHz, D_2O).

En conclusion, un premier chélatant bifonctionnel bispidine-biotine a été obtenu en vue d'essais biologiques, notamment sur des anticorps streptavidinés (Figure 4. 13).

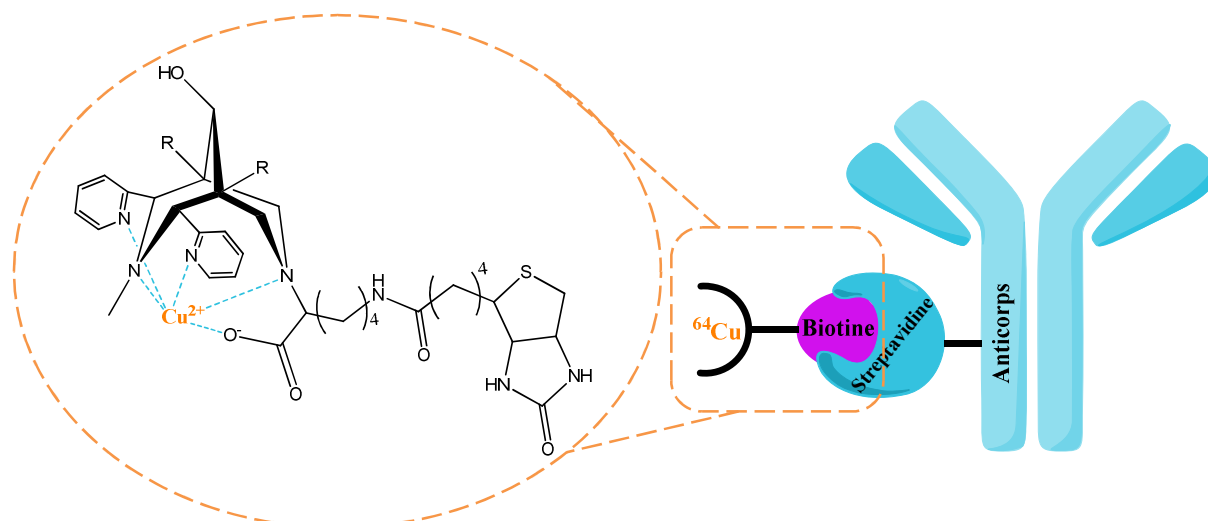


Figure 4. 13: Couplage du ^{64}Cu -CBF avec un anticorps marqué par la streptavidine.

4. Insertion d'une fonction réactive, le maléimide

Des essais d'insertion d'une fonction maléimide sur la chaîne latérale de la lysine ont ensuite été tentés. En effet, le motif maléimide est particulièrement intéressant pour le couplage avec des biomolécules vectrices puisqu'il est très stable en solution aqueuse et permet un greffage régiosélectif sur les résidus cystéines.^{16,17} Un synthon NHS-maléimide a tout d'abord été synthétisé en deux étapes one-pot^{18,19} (Schéma 4. 9).

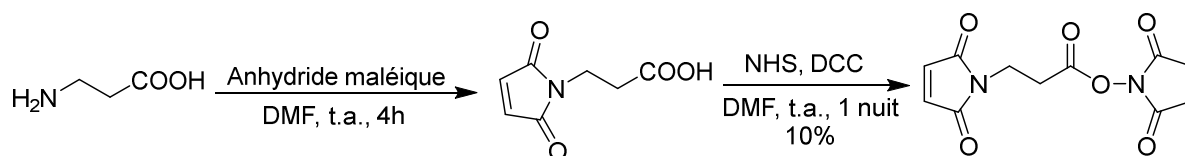
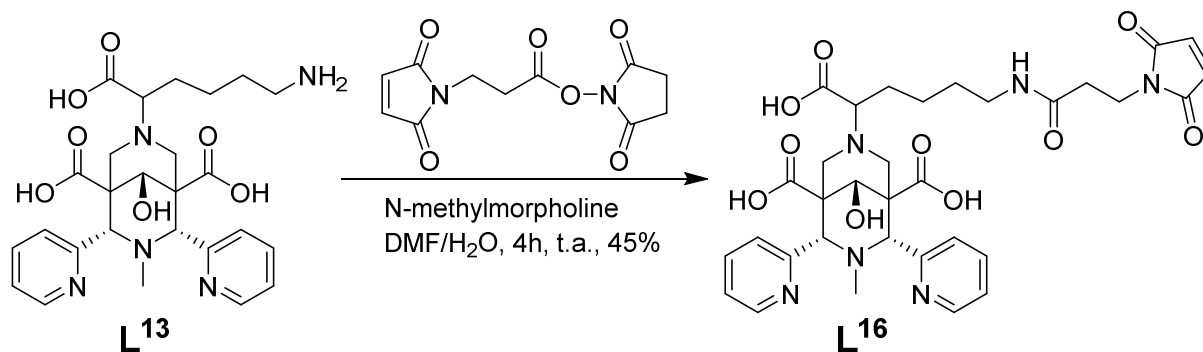


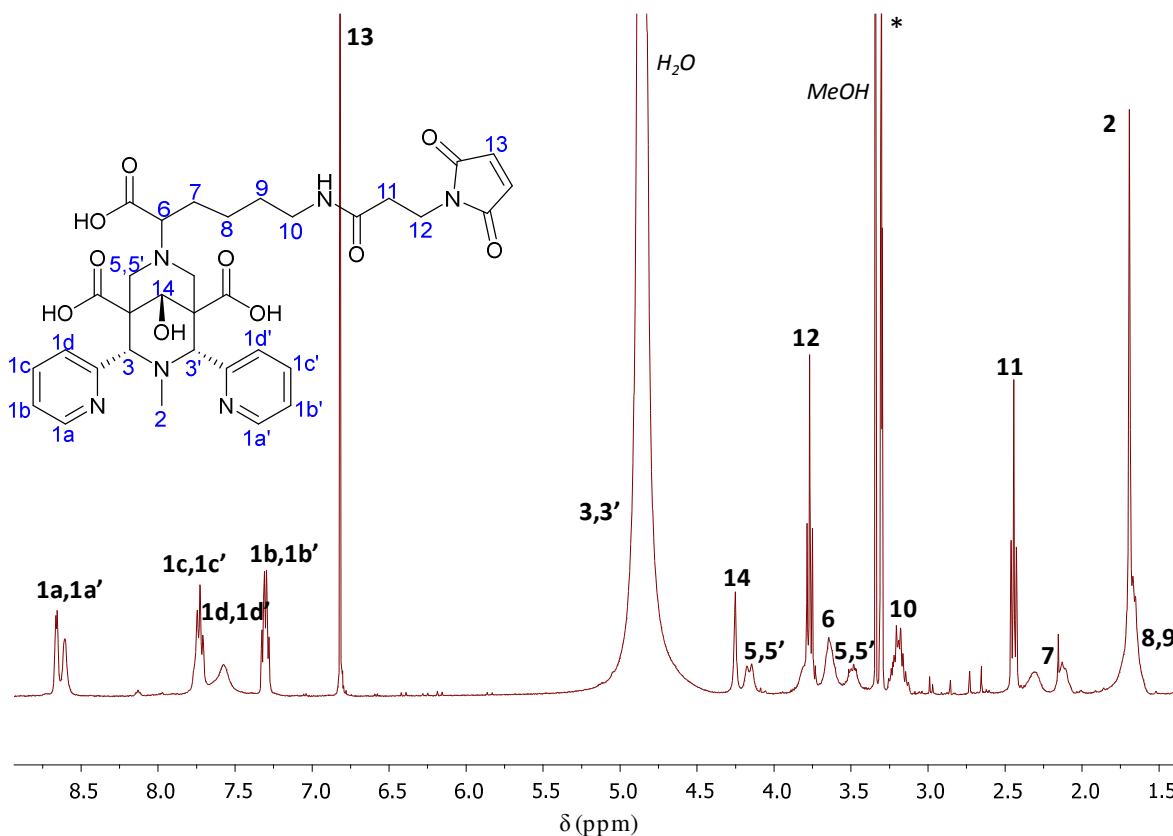
Schéma 4. 9: Synthèse du synthon NHS-maléimide.

Puis une réaction de couplage, similaire à celle décrite ci-dessus, a été effectuée (Schéma 4. 10).


 Schéma 4. 10: Synthèse du ligand L^{16} .

La seule différence réside dans le changement de base utilisée. En effet, un premier essai a été réalisé avec la DIPEA, mais la molécule attendue n'a pas été obtenue car une addition nucléophile d' H_2O sur le maléimide s'effectue, entraînant une ouverture du cycle. Un deuxième essai a alors été effectué en présence d'une autre base, la N-méthylmorpholine (NMM) ($\text{pK}_a = 10,1$ (DIPEA), $7,41$ (NMM)^{20,21}) qui nous a permis d'obtenir la bonne molécule. La purification a été réalisée par chromatographie sur colonne en phase inverse (100% H_2O à 100% MeOH).

Le ligand L^{16} a ensuite été caractérisé par RMN 1D et 2D (Figure 4. 14) et par spectrométrie de masse ($m/z = 678,26$, $[\text{M}+\text{H}]^+$).


 Figure 4. 14: Spectre RMN ^1H du ligand L^{16} (400 MHz, $^*\text{CD}_3\text{OD}$).

Les signaux caractéristiques du motif maléimide sont bien présents (H_{13}) et le proton H_{10} voit son signal fortement déblindé ce qui confirme que le couplage via l'ester NHS a bien fonctionné.

Le ligand fonctionnalisé a ensuite été testé afin de vérifier la réactivité du motif maléimide en présence d'un acide aminé cystéine. Pour cela, le ligand L^{16} a été mis en présence d'un peptide modèle de neuf acides aminés (GP120) afin de vérifier la régiosélectivité du couplage (Schéma 4. 11).

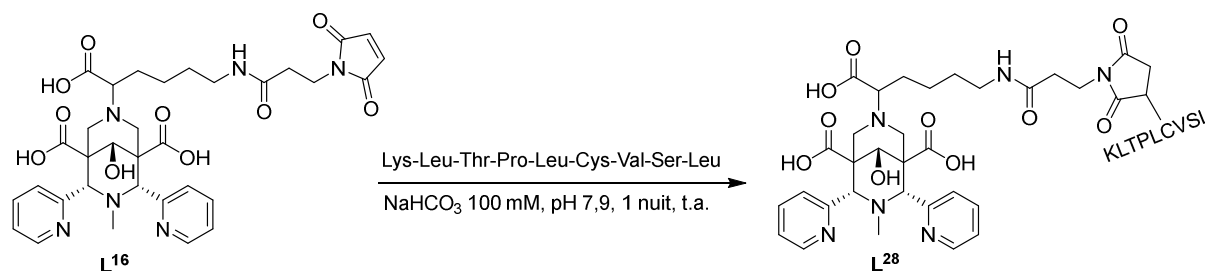


Schéma 4. 11: Couplage régiosélectif du peptide GP120 sur L^{16} .

Afin de confirmer le couplage au peptide GP120 via la fonction maléimide, une caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été effectuée au Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (Pr Laurence Sabatier) (Figure 4. 15).

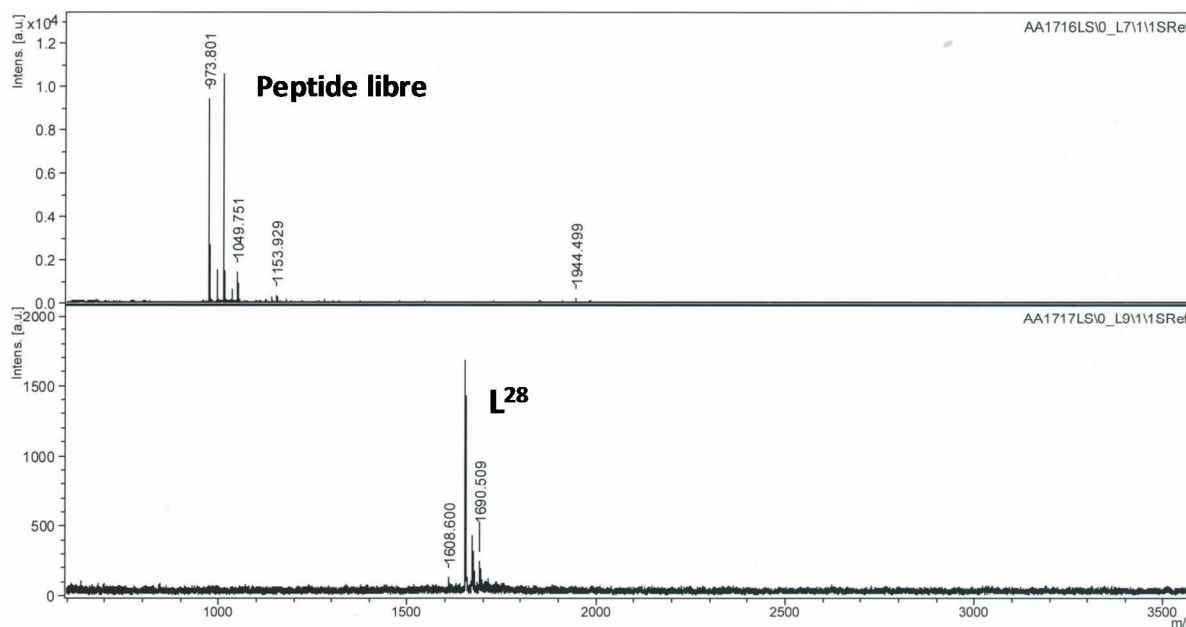


Figure 4. 15: Spectres de masse (MALDI) du peptide libre (haut) et du ligand couplé au peptide, L^{28} (bas).

Sur le spectre de masse du ligand L^{28} , nous pouvons constater qu'il ne reste plus de peptide libre. Un ajout d'iodoacétamide, réagissant classiquement avec les motifs cystéines, n'a montré

aucun changement au niveau du spectre de masse. Celles-ci ont bien réagi avec la fonction maléimide du ligand.

Un couplage quantitatif et régiosélectif a donc été obtenu dans des conditions douces, ce qui montre que le ligand L¹⁶ a toutes les propriétés requises pour une application au marquage d'anticorps dans le cadre de l'immuno-TEP.

5. Synthèse et caractérisation d'une sonde bimodale

En vue de l'obtention d'une sonde bimodale (TEP + imagerie optique), le ligand L¹³ a été couplé à un motif bore-dipyrométhène (Bodipy). Les structures Bodipy sont des fluorophores organiques qui présentent l'intérêt d'absorber fortement dans le visible et d'émettre une fluorescence avec un rendement quantique important (0,2 à 0,8).^{22,23,24} La synthèse de cette sonde bimodale a été réalisée grâce à un motif Bodipy synthétisé à Dijon, par le Dr Franck Denat, Damien Lhenry et le Dr Christine Goze (ICMUB, équipe P2DA). Ce motif possède un maximum d'excitation à 522 nm et d'émission à 543 nm.

Le motif Bodipy étant activé par une fonction ester-NHS, le couplage avec le ligand L¹³ a été effectué dans les mêmes conditions que pour l'obtention du ligand L¹⁵ (Schéma 4. 12).

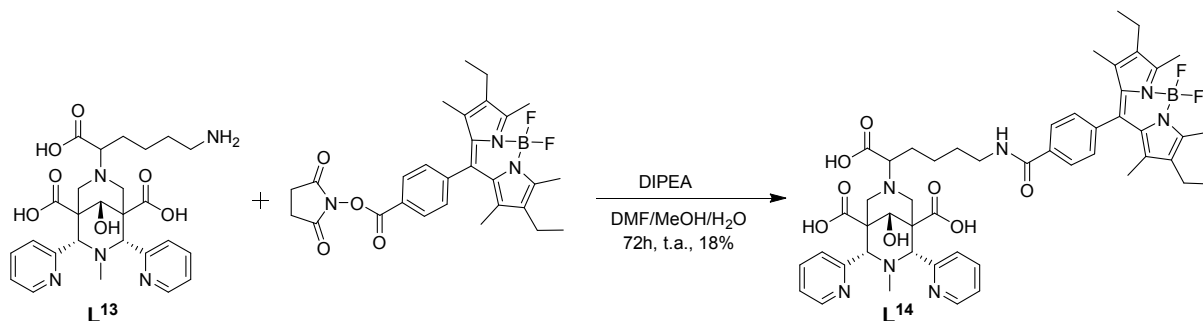


Schéma 4. 12: Synthèse du ligand L¹⁴.

Le produit pur a été obtenu après trois purifications par colonnes chromatographiques sur phase inverse (1) 30/70 MeOH/H₂O à 100% MeOH, 2) 60/40 MeOH/ H₂O et 3) 70/30 MeOH/ H₂O à 100% (colonne fonctionnalisée C18AQ), d'où le faible rendement final obtenu. Une fois le ligand L¹⁴ obtenu, celui-ci a pu être caractérisé par RMN ¹H (Figure 4. 16) et par spectrométrie de masse ($m/z = 934,45$ ($[M+H]^+$)).

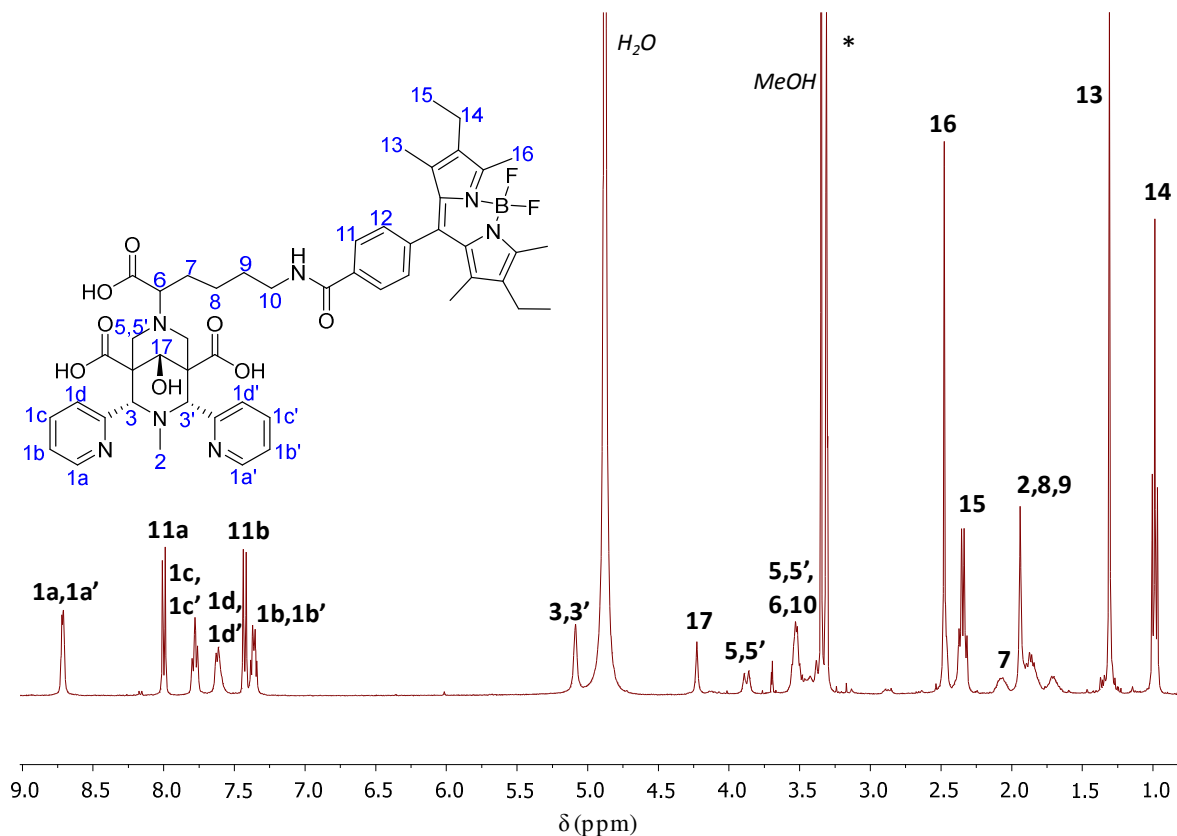


Figure 4. 16: Spectre RMN ^1H du ligand L^{14} (400 MHz, $^*\text{CD}_3\text{OD}$).

Le couplage est mis en évidence par la présence des protons appartenants au motif Bodipy ainsi que par le déblindage du proton H_{10} . Des études en spectroscopie UV-visible ainsi qu'en spectrofluorimétrie ont ensuite été effectuées afin d'analyser le comportement du ligand bimodal en milieu tamponné (Tris-HCl 0,1M, pH 6,5-7,5) ainsi qu'en milieu sérique (sérum foetal de bœuf, FBS).

Il a été observé précédemment²⁵ que la complexation du cuivre(II) par le motif DOTA (couplé au Bodipy par une liaison peptidique) entraîne une diminution de la fluorescence proportionnelle à l'ajout de métal, due à un phénomène de transfert d'électron photo-induit (photo-induced electron transfer, PET). Le même phénomène est observé avec le motif L^{14} et nous a permis de suivre la complexation du Cu^{II} par le ligand par spectrofluorimétrie.^{26,27}

Des tests ont tout d'abord été effectués en ajoutant différents métaux à une solution de ligand L^{14} libre dans le tampon Tris à pH 7,4 (Figure 4. 17).

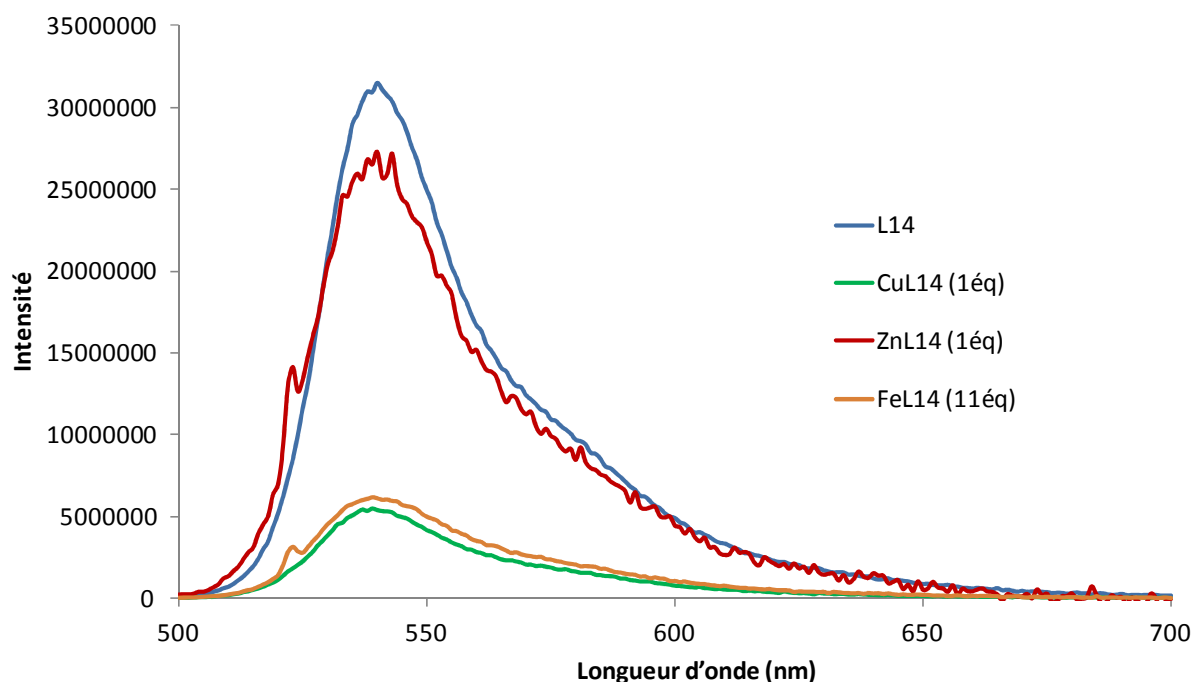


Figure 4.17: Spectres d'émission du ligand L^{14} libre et des complexes de $Cu(ClO_4)_2$, $ZnCl_2$ et $FeCl_3$. Solvant : tampon Tris 0,1 M, pH 7,4, $\lambda_{exc} = 522$ nm.

Les spectres d'émission montrent que l'on obtient bien une diminution de la fluorescence d'environ 83% lors de l'ajout de cuivre(II), dû au phénomène de PET. Une diminution du même ordre de grandeur (80%) est constatée dans le cas de l'ajout de fer(III), ce qui est logique puisque le fer(III) peut également subir un transfert d'électron photo-induit. Par ailleurs, l'ajout de zinc(II) n'a quasiment aucune influence sur la fluorescence du Bodipy et la faible diminution constatée (15%) pourrait être due à la présence d'une autre interaction en solution. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature concernant le phénomène de transfert d'électron photo-induit.

Un titrage de L^{14} par le Cu^{II} a ensuite été effectué en spectrofluorimétrie afin d'étudier la complexation du cuivre(II) et ainsi vérifier que la présence du motif Bodipy en R_2 ne diminue pas l'affinité du métal pour la bispidine (Figure 4. 18).

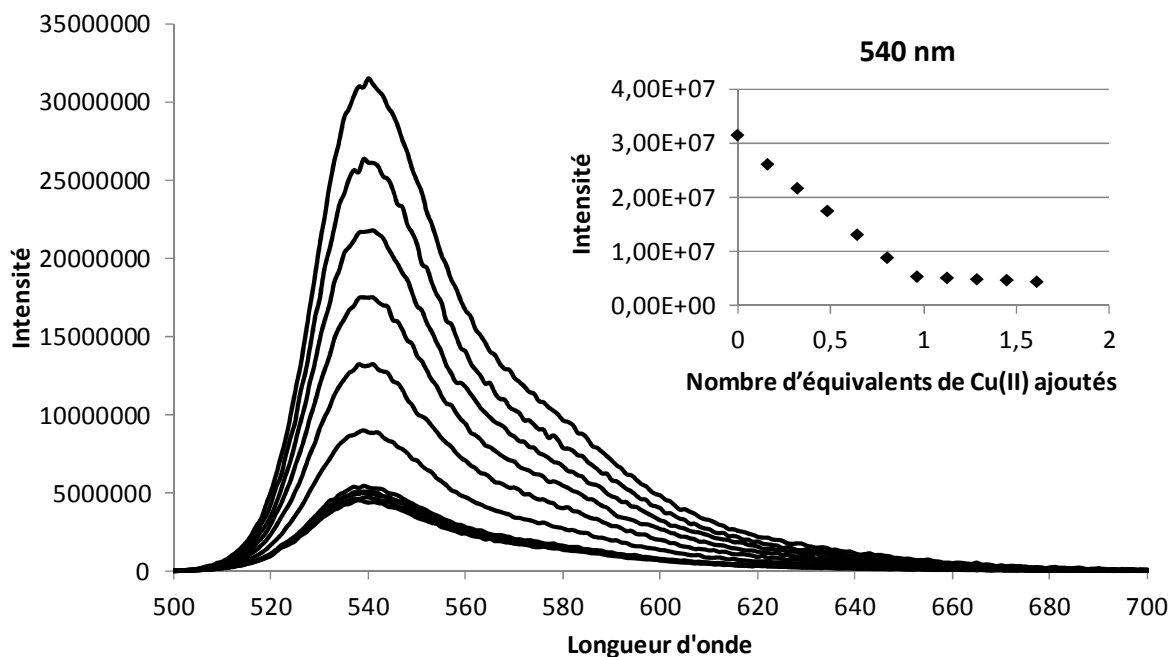


Figure 4. 18: Titrage en spectrofluorimétrie du ligand L^{14} par $Cu(ClO_4)_2$. Solvant: tampon Tris pH 7,4, $[L^{14}]_i = 4,63 \times 10^{-5} M$, $[Cu(ClO_4)_2]_{aj} = 5,05 \times 10^{-4} M$, $\lambda_{ex} = 522 nm$.

Ce titrage nous indique bien que le cuivre(II) conserve sa forte affinité pour le ligand bispidine malgré la présence de l'unité Bodipy. En effet, en suivant l'évolution de la fluorescence vers 540 nm, nous pouvons constater qu'un plateau est atteint à partir de 1 équivalent. L'allure de la courbe est en accord avec l'obtention d'une espèce 1 : 1, car il n'y a plus de variation dès l'ajout d'un équivalent de cuivre(II), et avec une constante de complexation forte (trop élevée pour être déterminée expérimentalement par ce titrage).

L'étude cinétique de la complexation indique qu'il faut environ 15 minutes pour atteindre un plateau et donc complexer totalement le ligand (Figure 4. 19). La complexation serait donc légèrement plus lente que dans le cas des ligands L^3 et L^9 (chap. III), du fait de l'encombrement stérique induit par le motif Bodipy.

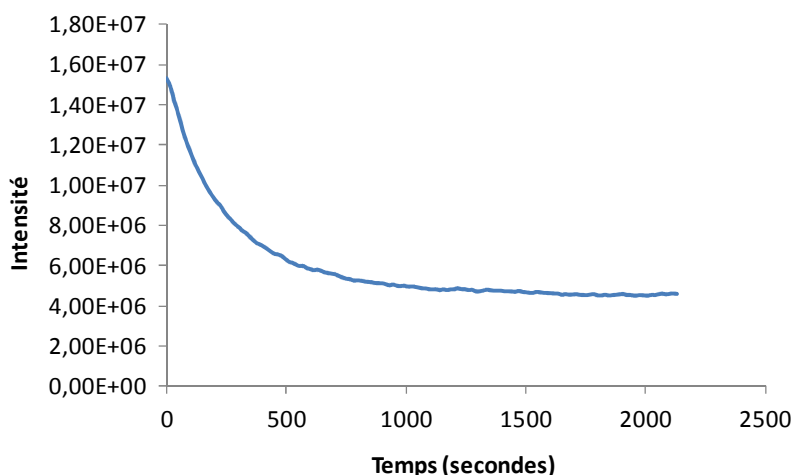


Figure 4. 19: Suivi de la cinétique de fluorescence lors de la complexation du ligand L^{14} au cuivre(II). Solvant : tampon Tris pH 7,4, $\lambda_{exc} = 522 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$.

Les rendements quantiques et temps de vie ont également été calculés dans le tampon Tris (pH 6,5 et 7,4) (Tableau 4. 1).

	Temps de vie (ns) avec prompt	Rendements quantiques (Φ)
Ligand libre L^{14}	5,3	39%
Complexe CuL^{14}	4,3	10%

Tableau 4. 1: Valeurs des temps de vie de l'état excité et rendements quantiques de luminescence obtenus pour le ligand L^{14} et pour le complexe de Cu^{II} correspondant.

Après ajout du cuivre(II), le rendement quantique reste correct et devrait permettre l'utilisation de ce ligand comme sonde bimodale malgré la diminution de la fluorescence due au PET.

Afin d'évaluer l'inertie cinétique du complexe, un test de compétition avec l'EDTA a été effectué. La fluorescence n'a pas été affectée lors de l'ajout de 200 équivalents d'EDTA à température ambiante, ce qui veut dire que le Cu^{II} n'a pas été extrait de la bispidine. Dans le cas contraire, une augmentation de la fluorescence aurait été observée.

L'étude a été poursuivie par des tests en milieu sérique (Sérum de veau fœtal (FBS)) dont le suivi a été rendu possible grâce à la fluorescence du motif Bodipy à $\lambda_{em} = 543 \text{ nm}$.

Lorsque le complexe de Cu^{II} est étudié dans le milieu biologique (après avoir été formé en milieu tamponné Tris), son spectre de fluorescence est moins intense que celui du ligand libre dans le FBS (60% de l'intensité environ) (Figure 4. 20), en accord avec le plus faible rendement quantique du complexe de $Cu(II)$.

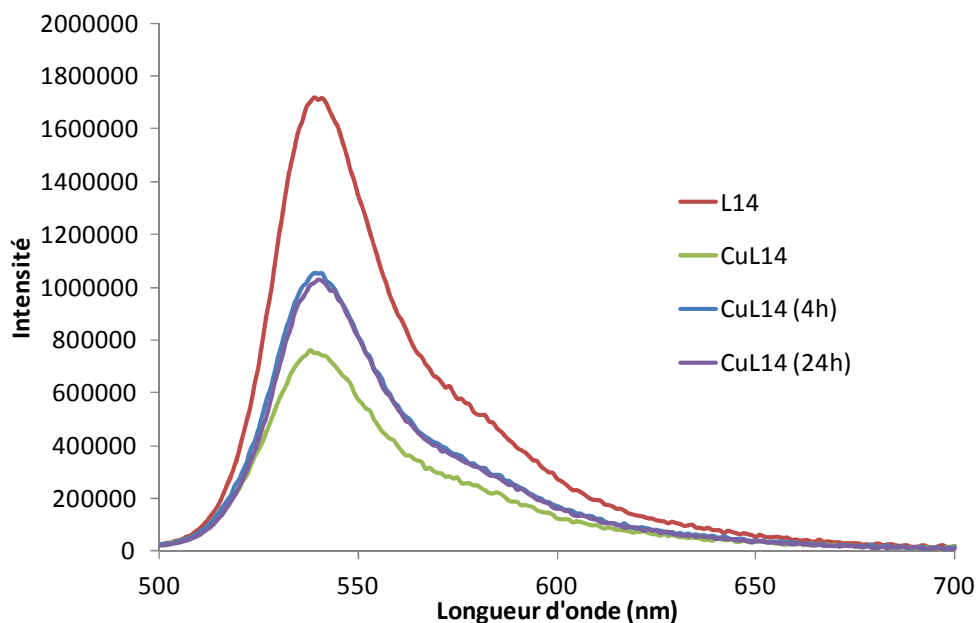


Figure 4. 20: Etude spectrofluorimétrique de l'ajout de cuivre(II) sur le ligand L^{14} . Solvant : sérum de bovin foetal, $[L^{14}] = [Cu(ClO_4)_2] = 7,46 \times 10^{-6} M$, $\lambda_{ex} = 522 nm$.

Cependant, une réaugmentation du signal est observée au cours du temps (environ 44%) qui peut être due à une démétallation partielle du cuivre(II), à une transmétallation par un métal induisant une diminution de la fluorescence moins importante que le cuivre(II) ou encore à une augmentation de l'intensité d'émission du motif Bodipy en milieu sérique. Malheureusement, des problèmes de solubilité du motif Bodipy-NHS dans le sérum nous ont empêchés de vérifier cette dernière hypothèse.

Deux observations viennent corroborer la supposition d'un effet du sérum sur le motif Bodipy, indépendamment de la complexation du métal. D'une part, il a été observé une augmentation du signal du ligand libre dans le sérum (Figure 4. 21).

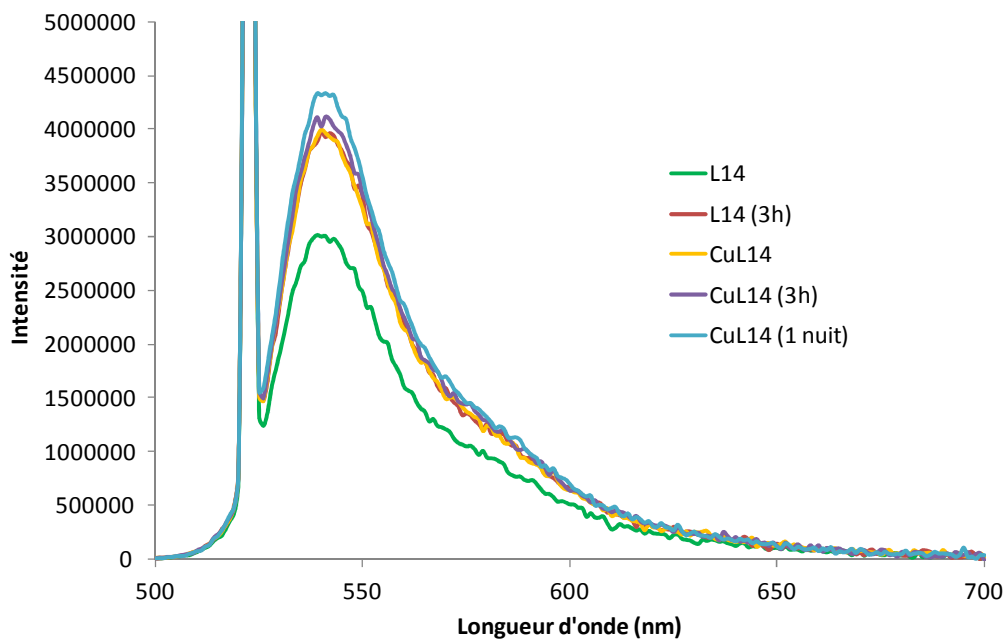


Figure 4. 21: Etude par spectrofluorimétrie du ligand L^{14} dans le sérum sans puis avec ajout de cuivre(II). Solvant : sérum de bovin foetal, $[L^{14}] = [Cu(ClO_4)_2] = 3,4 \times 10^{-6} M$, $\lambda_{ex} = 522 nm$.

L'ajout de cuivre(II) directement dans le sérum contenant le ligand libre n'induit, quant à lui, pas vraiment de changement. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que i) soit le ligand est déjà complexé à un autre métal, ii) soit le métal va se complexer avec un autre ligand présent dans le milieu biologique.

D'autre part, l'étude du complexe de ZnL^{14} en milieu FBS a également montré une augmentation du signal (+20% au total) alors que ce métal ne devrait induire aucune modification de l'intensité (cf. complexation dans le tampon Tris) (Figure 4. 22).

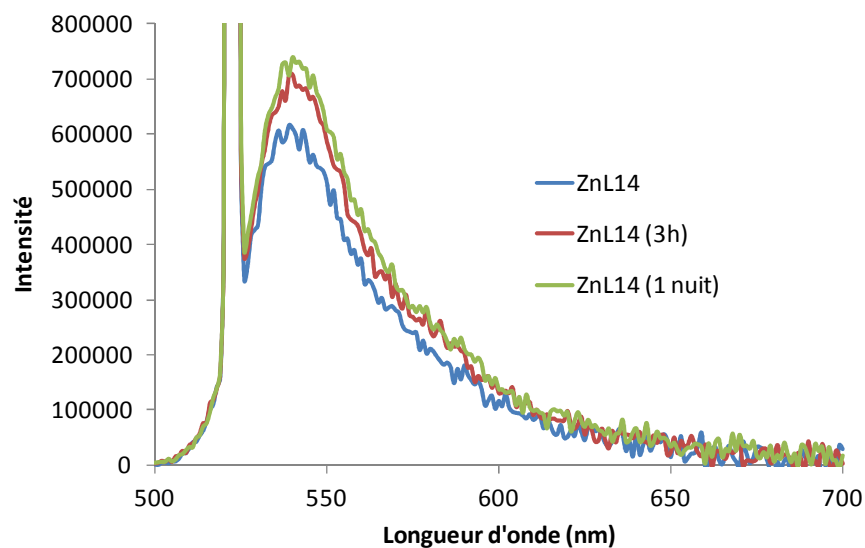


Figure 4. 22: Etude spectrofluorimétrique du complexe ZnL^{14} dans le sérum de bovin foetal, $[L^{14}] = [ZnCl_2] = 3,4 \times 10^{-6} M$, $\lambda_{ex} = 522 nm$.

En conclusion, l'évolution de l'intensité en milieu sérique ne semble pas dépendre exclusivement du métal complexé. Cette observation a déjà été notifiée dans la littérature par A. Harriman, où la luminescence du composé contenant un motif Bodipy augmentait en présence d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique).²⁸ Il est donc difficile de conclure quant à la stabilité du complexe dans le sérum. De plus, le sérum contient de nombreux cations (Hg^{2+} , K^+ , Ti^{2+} , V^{5+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^+ , Zn^{2+} , Ga^{2+} , Se^{2-} , Rb , Sr , Mo) dont les proportions varient selon le genre, l'âge et le régime de l'animal ainsi que le protocole de préparation.²⁹ Les perspectives pour cette sonde bimodale seraient d'effectuer des tests *in vitro* avec du cuivre 64 afin de vérifier la bonne stabilité du complexe par radio-TLC, mais également la possible utilisation du motif Bodipy en imagerie optique.

6. Propriétés de complexation au Technétium 99m

Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ est un radioisotope émetteur de photons γ dont le temps de demi-vie est de 6 h. Il est très largement utilisé pour l'imagerie monophotonique SPECT.³⁰ Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ adopte des degrés d'oxydation variables, de +VII à -I, avec une préférence pour les états +I, +III et +IV. Le degré d'oxydation du technétium dans un complexe va fortement dépendre de la nature du ligand. Un ligand mou favorise les formes « acides mous » donc les états d'oxydation les plus faibles, et inversement, les ligands durs favorisent les degrés d'oxydation élevés. Par exemple, le cyclam forme un complexe de technétium à l'état +V en présence d'étain stanneux.³¹ Un comportement similaire était attendu pour les bispidines et nous avons donc profité du fait que du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ soit disponible à l'IPHC pour faire des tests de marquage de nos ligand L^3 et L^{13} , en collaboration avec le Dr Ali Ouadi, dans le but de faire de l'imagerie TEMP *in vivo*.

La réaction de marquage au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ s'effectue classiquement en milieu aqueux (tampon Tris) par réduction du pertechnétate (TcO_4^-) par un large excès de SnCl_2 en présence du ligand. L'avancement de la réaction est suivi par CCM. Après réaction, dépôt et migration sur plaque, la radioactivité a été mesurée par un lecteur de plaque électronique afin de voir quelles espèces étaient présentes (Figure 3. 42).

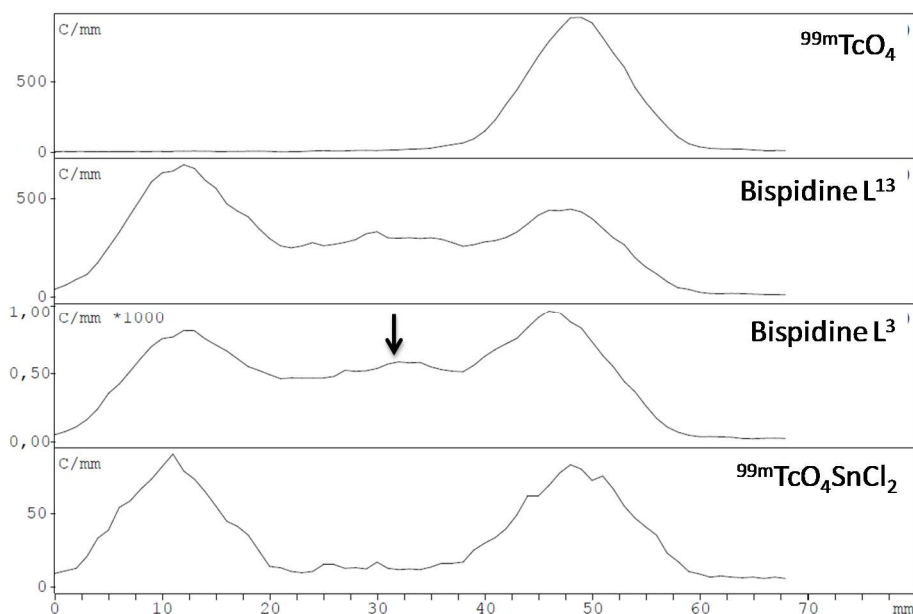


Figure 3. 42: Chromatographies sur couche mince des différentes formes de ^{99m}Tc et des ligands L^3 et L^{13} marqués (phase inverse, éluant : $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50/50).

D'après ces résultats, on peut conclure qu'il y a complexation du ^{99m}Tc par le ligand L^3 ($R_f = 0,44$) mais que celle-ci n'est pas totale puisqu'il reste du ^{99m}Tc libre (pertechnétate, $R_f = 0,7$ et complexe d'étain, $R_f = 0,16$). La sphère de coordination du ligand L^3 ne doit pas être suffisamment bien adaptée à ce métal pour obtenir une complexation satisfaisante du ^{99m}Tc .

7. Autre voie de fonctionnalisation : alkylation de l'alcool tertiaire

En parallèle de cette voie de fonctionnalisation par le motif lysine en position R_2 , une autre voie a été développée. Cette nouvelle voie pour l'insertion d'un espaceur ou d'un motif spécifique d'une cible biologique consiste à utiliser l'alcool tertiaire obtenu après la réduction de la cétone (Schéma 4. 13).

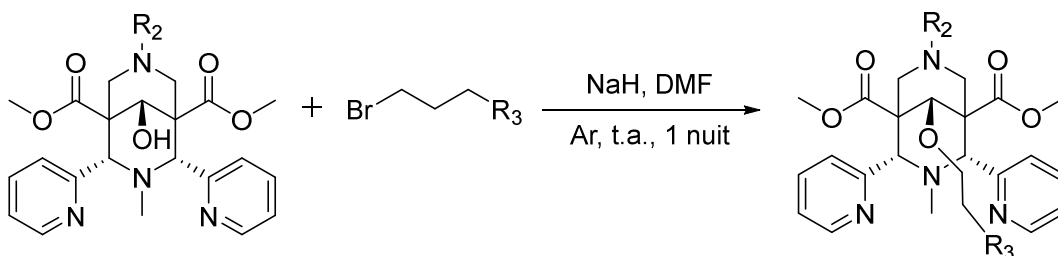


Schéma 4. 13: Voie de fonctionnalisation par alkylation de l'alcool tertiaire.

Cette alkylation s'effectue selon des conditions classiques de Williamson,^{32,33} en présence d'une base forte (NaH), d'un solvant anhydre et d'une chaîne bromée.

L'utilisation de cette voie aurait pour avantage de pouvoir insérer n'importe quel groupement en position R₂ et pas nécessairement un motif bifonctionnel tel que la lysine. De plus, au niveau de la structure tridimensionnelle, le motif de ciblage se retrouverait « au-dessus » du bicyclic et de la sphère de complexation, ce qui diminuerait le risque d'un encombrement stérique et donc d'une diminution d'affinité du métal pour la bispidine.

Des premiers essais ont été effectués en excès de bromopropane, sur les ligands L⁵ et L⁸ (Schéma 4. 14).

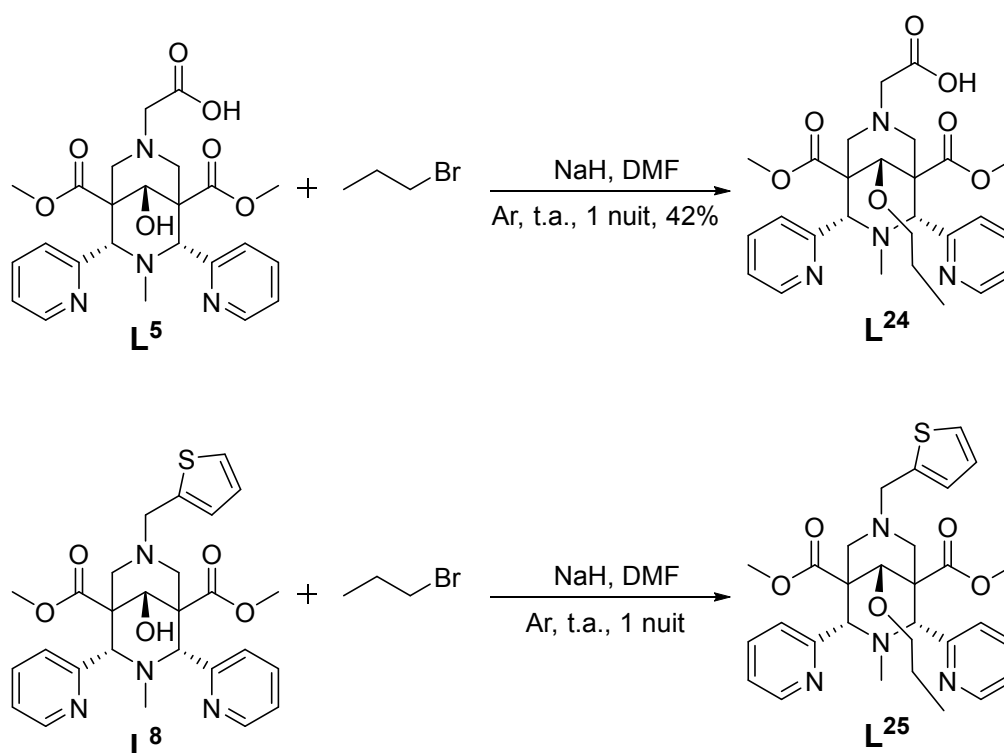


Schéma 4. 14: Alkylation des ligands L⁵ et L⁸.

Le ligand L²⁴ a été purifié sur colonne de silice (DCM/MeOH 95/5 à 80/20) tandis que le ligand L²⁵ a été obtenu par précipitation dans H₂O puis centrifugation. L'obtention des ligands L²⁴ et L²⁵, confirmée par RMN ¹H, a montré que la réaction s'effectuait bien dans ces conditions (Figure 4. 23, Figure 4. 24).

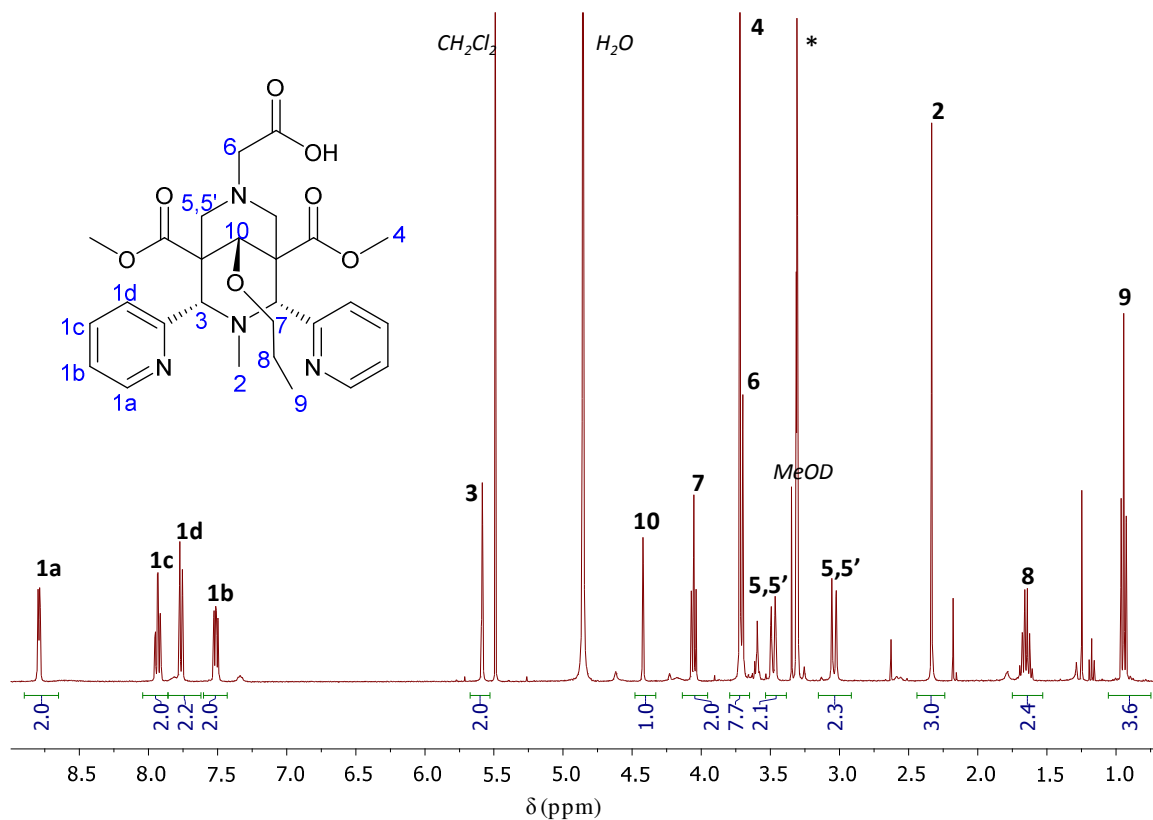


Figure 4. 23: Spectre RMN ^1H du ligand L^{24} ($^*\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz).

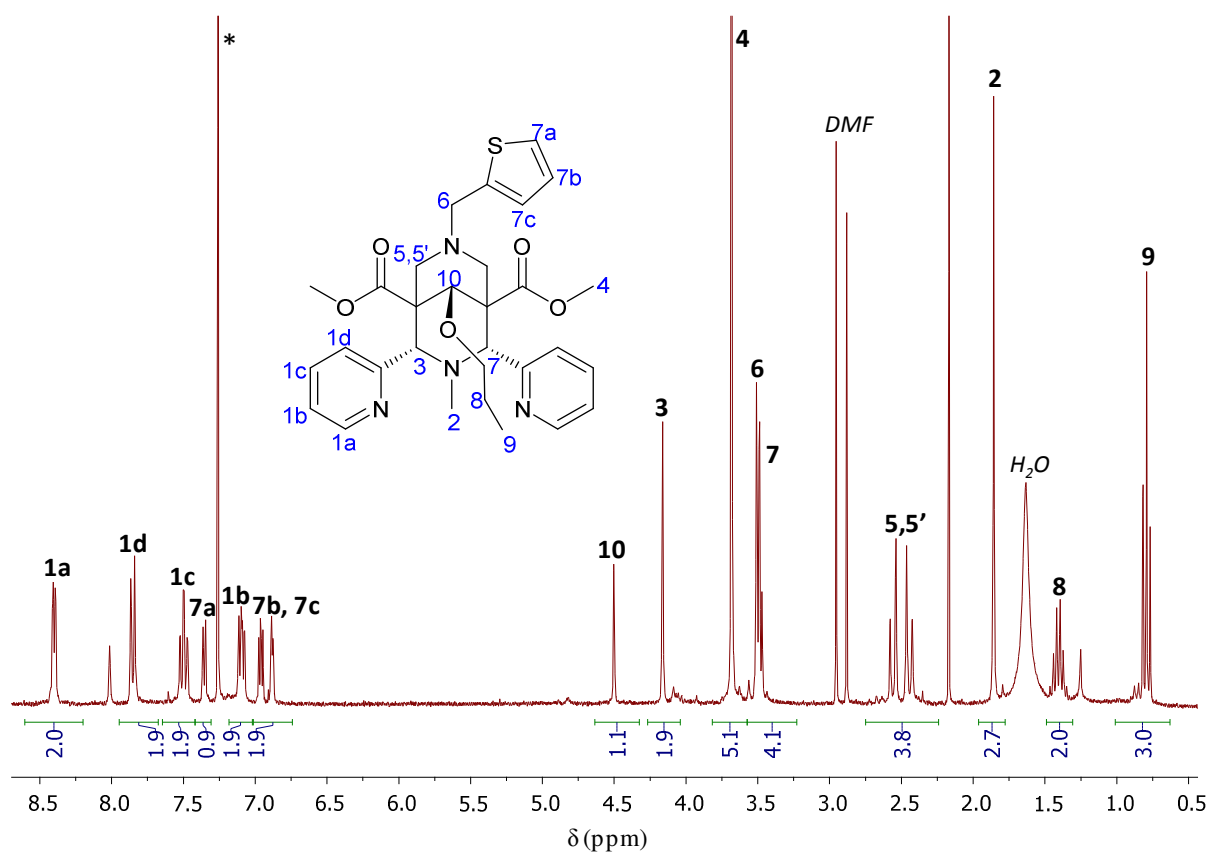


Figure 4. 24 : Spectre RMN ^1H du ligand L^{25} ($^*\text{CDCl}_3$, 300 MHz).

En effet, les signaux de la chaîne alkylée (propane) sont bien présents et les intégrales sont en accord avec les autres signaux du ligand. Dans le cas du ligand L²⁴, le déblindage du proton H₇ est observé ($\delta = 3,4$ ppm pour le bromopropane). Dans le cas du ligand L²⁵, on peut observer une modification des caractéristiques du système AB pour les protons H_{5,5'} par rapport au ligand de départ L⁸ (chap. II). Cela est en accord avec l'alkylation de l'alcool tertiaire qui est proche de ces protons H_{5,5'}.

Au vu de l'obtention de ces deux espèces, il a été décidé de poursuivre dans cette voie de fonctionnalisation. Une nouvelle synthèse a été effectuée à partir d'une chaîne possédant une fonction brome d'un côté, pour l'alkylation, et une fonction amine protégée de l'autre côté, pour le couplage ultérieur à un motif ciblant (Schéma 4. 15).

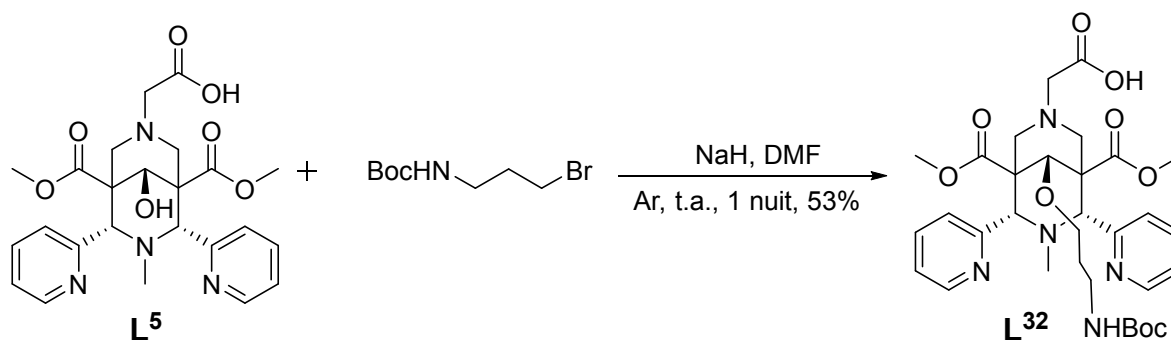


Schéma 4. 15: Synthèse du ligand L³² par alkylation de Williamson.

Ce nouvel essai avec une chaîne bromée réactive a été purifié sur colonne d'alumine (DCM/MeOH) et a bien fonctionné puisque les signaux attendus ont été observés par RMN ¹H (Figure 4. 25) et par spectrométrie de masse ($m/z = 642,32$ [M+H]⁺).

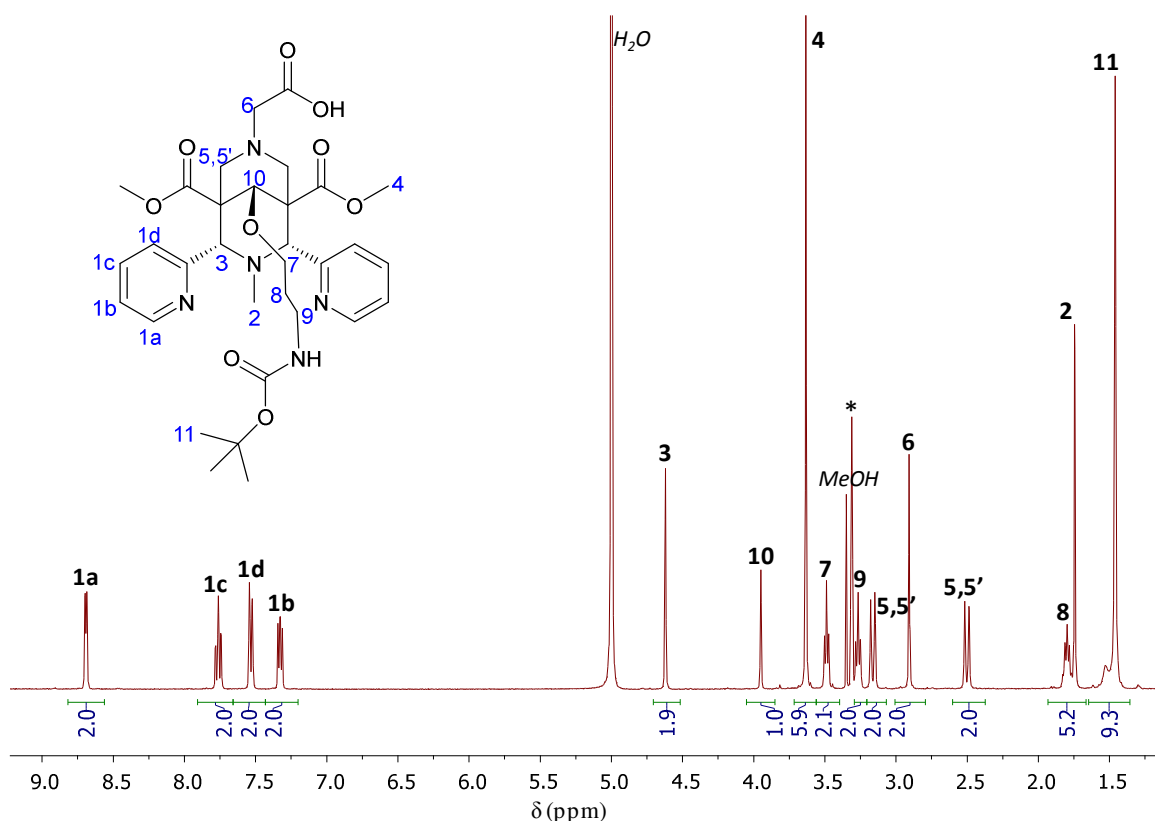


Figure 4. 25: RMN ^1H du ligand L^{32} en présence de NaOD (* CD_3OD , 400 MHz).

Les signaux des protons $\text{H}_{7-9,11}$ sont bien présents et les intégrales indiquent l'obtention d'une seule espèce alkylée. Ceci est confirmé par la présence d'une seule famille de signaux sur l'ensemble du spectre. Par rapport au ligand L^{24} , des différences sont observées au niveau des protons $\text{H}_{5,5'}$, H_6 , H_7 , H_2 et H_3 . Cela peut être lié à la présence du NaOD ajouté pour simplifier le spectre et n'obtenir qu'un état de protonation. Les déplacements chimiques des protons du bicyclic peuvent alors être influencés par le pH et/ou la coordination du sodium.

Une fois ce ligand obtenu, ce dernier a été saponifié au niveau de ses esters méthyliques et purifié par colonne chromatographique sur phase inverse (100% H_2O à 100% MeOH) (Schéma 4. 16).

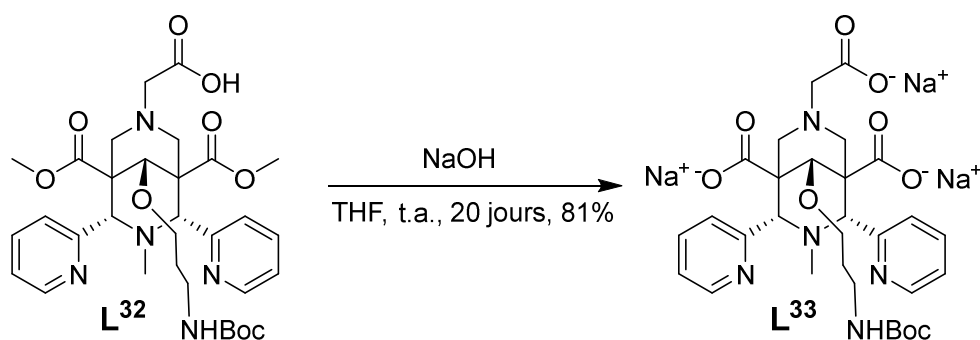


Schéma 4. 16: Saponification du ligand L^{32} .

Le spectre RMN ^1H montre bien la disparition du pic correspondant aux fonctions esters (Figure 4. 26).

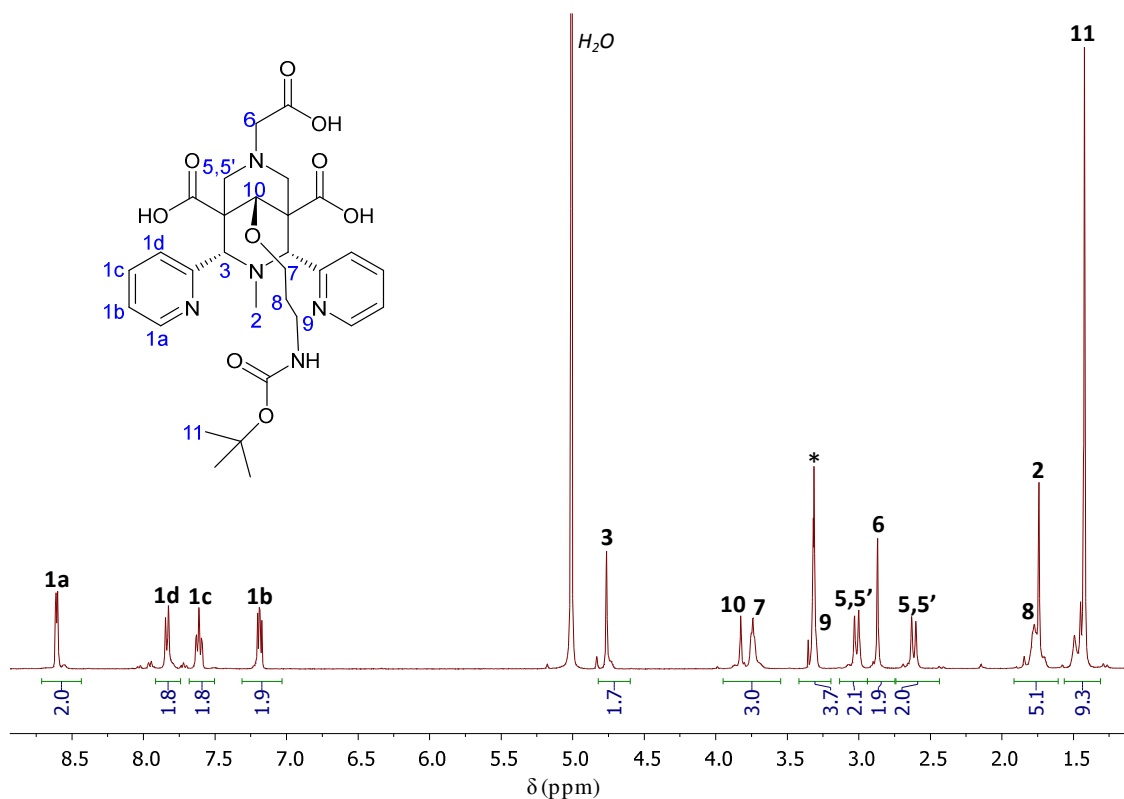


Figure 4. 26: Spectre RMN ^1H du ligand L^{33} ($^*\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz).

D'autre part, l'ensemble des signaux du spectre RMN ^{13}C a pu être attribué par RMN DEPT et HSQC et montre bien la présence d'une seule forme bispidine alkylée (Figure 4. 27).

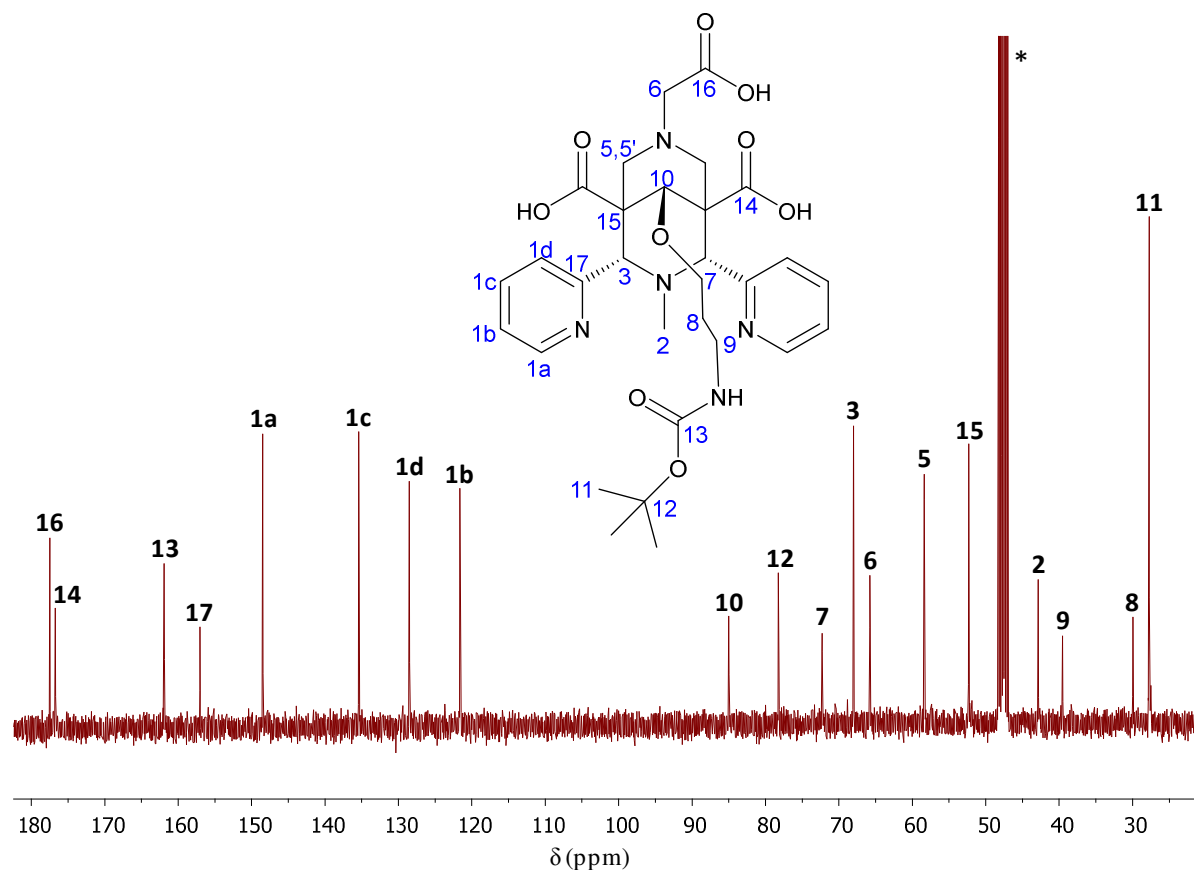


Figure 4. 27: Spectre RMN ^{13}C du ligand L^{33} (* CD_3OD , 400 MHz).

La déprotection du groupement Boc a ensuite été effectuée en milieu acide ($\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)₁ (Schéma 4. 17).

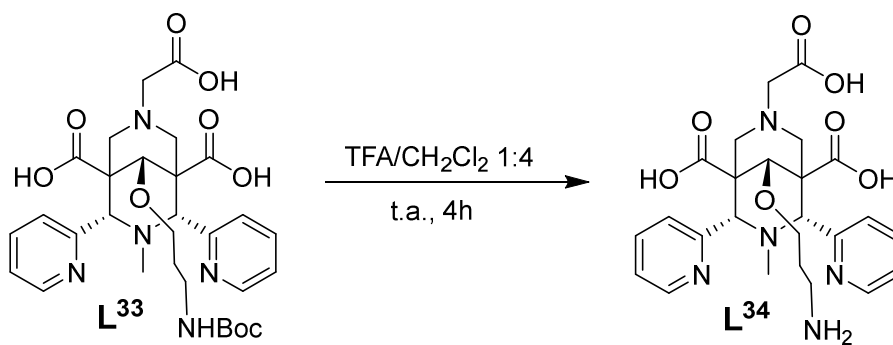


Schéma 4. 17: Déprotection du groupement protecteur Boc de l'amine.

Cette réaction est en cours de purification mais le produit attendu a tout de même pu être caractérisé par RMN ^1H (Figure 4. 28).

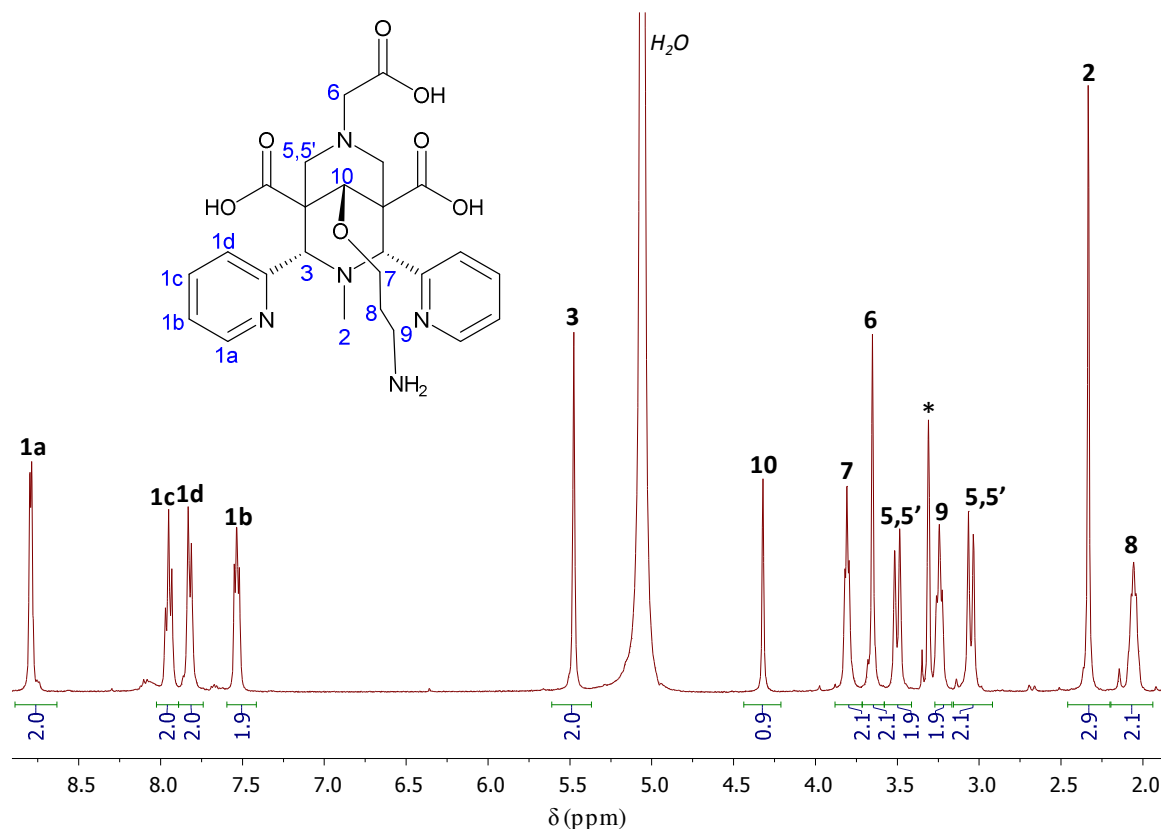


Figure 4. 28 : Spectre RMN ^1H du ligand L^{34} (* CD_3OD , 400 MHz).

On peut constater la disparition du pic correspondant au groupement protecteur Boc. Un cinquième chélateur bifonctionnel semble donc bien être obtenu par cette autre voie de fonctionnalisation. Il reste à purifier le ligand L^{34} et faire un essai d'activation par le synthon NHS-maléimide, déjà utilisé dans le cas du ligand L^{13} .

8. Conclusion

Pour conclure sur cette partie portant sur la fonctionnalisation et le couplage, nous avons réussi à développer trois voies de couplage différentes, les deux premières par la position R_2 via un couplage peptidique ou par l'insertion d'un acide aminé bifonctionnel lors de la synthèse (la lysine), et la troisième par l'alkylation de l'alcool tertiaire présent sur le dessus du bicyclic. Ces différentes voies nous ont permis d'obtenir cinq chélateurs bifonctionnels : deux pour l'insertion de divers motifs, deux pour le ciblage d'entité biologique et un pour l'obtention d'une sonde bimodale.

La dernière voie de fonctionnalisation semble la plus prometteuse car elle pourra permettre l'insertion d'une plus grande variété de groupements en position R_2 et donc une modification plus aisée de la sphère de coordination du métal. De plus, l'insertion de la chaîne réactive sur le dessus du cycle ne devrait pas diminuer l'affinité du métal pour le ligand.

Cependant, les premiers essais de fonctionnalisation par l'introduction de l'acide aminé lysine sont très concluants et ont démontré la possibilité d'obtenir un chélatant bifonctionnel du cuivre(II), qui a pu être couplé à différents motifs : le maléimide, la biotine et un motif Bodipy.

- ¹ Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
- ² Jaramillo, D.; Wheate, N. J.; Ralph, S. F.; Howard, W. A.; Tor, Y.; Aldrich-Wright, J. R. Polyamide Platinum Anticancer Complexes Designed to Target Specific DNA Sequences. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 6004–6013.
- ³ Whittaker, A. G.; Siegel, S. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Solvent Effects on the Hindered Internal Rotation of N, N-Disubstituted Amides. I. Dimethylformamide. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 3320–3324.
- ⁴ Wiberg, K. B.; Rablen, P. R.; Rush, D. J.; Keith, T. A. Amides. 3. Experimental and Theoretical Studies of the Effect of the Medium on the Rotational Barriers for N, N-Dimethylformamide and N, N-Dimethylacetamide. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4261–4270.
- ⁵ Fischer, G. Chemical Aspects of Peptide Bond Isomerisation. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 119–127.
- ⁶ Constantino, M. G.; Lacerda Jr., V.; da Silva, G. V. J.; Tasic, L.; Rittner, R. Principal Component Analysis of Long-Range “W” Coupling Constants of Some Cyclic Compounds. *J. Mol. Struct.* **2001**, *597*, 129–136.
- ⁷ Rabasso, N. Chimie organique: 1. Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques. *De Boeck Supérieur*, **2006**.
- ⁸ Börzel, H.; Comba, P.; Katsichtis, C.; Kiefer, W.; Lienke, A.; Nagel, V.; Pritzkow, H. Stabilization of Copper Dioxygen Compounds: Design, Synthesis, and Characterization. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1716–1721.
- ⁹ Born, K.; Comba, P.; Kerscher, M.; Linti, G.; Pritzkow, H.; Rohwer, H. Distortional Isomerism with Copper (I) Complexes of 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonane Derivatives. *Dalton Trans.* **2009**, 362–367.
- ¹⁰ Hathaway, B. J. The Correlation of the Electronic Properties and Stereochemistry of Mononuclear {CuN₄–6} Chromophores. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1972**, 1196–1199.
- ¹¹ Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R. Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science* **1989**, *243*, 85–88.
- ¹² Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K. The Biotin-(strept)avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 625–636.
- ¹³ Becker, J. M.; Wilchek, M.; Katchalski, E. Irreversible Inhibition of Biotin Transport in Yeast by Biotinyl-P-Nitrophenyl Ester. *PNAS* **1971**, *68*, 2604–2607.
- ¹⁴ Brinkley, M. A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens and Crosslinking Reagents. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2–13.
- ¹⁵ Jones, L. H.; Randall, A.; Napier, C.; Trevethick, M.; Sreckovic, S.; Watson, J. Design and Synthesis of a Fluorescent Muscarinic Antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 825–827.

- ¹⁶ McMahon, B. K.; Gunnlaugsson, T. Selective Detection of the Reduced Form of Glutathione (GSH) over the Oxidized (GSSG) Form Using a Combination of Glutathione Reductase and a Tb(III)-Cyclen Maleimide Based Lanthanide Luminescent “Switch On” Assay. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10725–10728.
- ¹⁷ Gregory, J. D. The Stability of N-Ethylmaleimide and Its Reaction with Sulfhydryl Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3922–3923.
- ¹⁸ Berry, D. J.; Ma, Y.; Ballinger, J. R.; Tavaré, R.; Koers, A.; Sunassee, K.; Zhou, T.; Nawaz, S.; Mullen, G. E.; Hider, R. C.; et al. Efficient Bifunctional Gallium-68 Chelators for Positron Emission Tomography: Tris (hydroxypyridinone) Ligands. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 7068–7070.
- ¹⁹ Ede, N. J.; Tregear, G. W.; Haralambidis, J. Routine Preparation of Thiol Oligonucleotides: Application to the Synthesis of Oligonucleotide-Peptide Hybrids. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 373–378.
- ²⁰ D.H. Ripin, D.A. Evans pKa's of Inorganic and Oxo-Acids Chem 206
- ²¹ Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A. Peptide Coupling in the Presence of Highly Hindered Tertiary Amines. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460–2465.
- ²² Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- ²³ Ziessel, R.; Ulrich, G.; Harriman, A. The Chemistry of Bodipy: A New El Dorado for Fluorescence Tools. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 496–501.
- ²⁴ Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. Fluorescent Indicators Based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–1172.
- ²⁵ Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F. First bodipy–DOTA Derivatives as Probes for Bimodal Imaging. *Chem. Comm.* **2009**, *46*, 8267–8269.
- ²⁶ Xie, R.; Yi, Y.; He, Y.; Liu, X.; Liu, Z.-X. A Simple BODIPY–imidazole-Based Probe for the Colorimetric and Fluorescent Sensing of Cu(II) and Hg(II). *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8541–8546.
- ²⁷ Wang, J.; Xie, Y.; Wang, Z.; Song, Q. A Highly Sensitive and Selective Naked-Eye Probe for Detecting Copper Ion Based on 2,3-Modified Bodipy Derivatives. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2014**, *194*, 149–155.
- ²⁸ Rostron, J. P.; Ulrich, G.; Retailleau, P.; Harriman, A.; Ziessel, R. Engineering of an Electronically Decoupled Difluoroindacene-Pyrene Dyad Possessing High Affinity for DNA. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 1241.
- ²⁹ Bryan, N.; Andrews, K.; Loughran, M.; Rhodes, N.; Hunt, J. Elucidating the Contribution of the Elemental Composition of Fetal Calf Serum to Antigenic Expression of Primary Human Umbilical-Vein Endothelial Cells in Vitro. *Bioscience rep.* **2011**, *31*, 199–210.
- ³⁰ Liu, S.; Chakraborty, S. ^{99m}Tc-Centered One-Pot Synthesis for Preparation of ^{99m}Tc Radiotracers. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6077.

³¹ Morphy, J. R.; Parker, D.; Alexander, R.; Bains, A.; Carne, A. F.; Eaton, M. A. W.; Harrison, A.; Millican, A.; Phipps, A.; Rhind, S. K.; et al. Antibody Labelling with Functionalised Cyclam Macrocycles. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1988**, 156.

³² Zefirova, O. N.; Raguzin, I. S.; Gogol, V. V.; Nurieva, E. V.; Belenikin, M. S. Phosphates of Bridgehead Alcohols as Putative Inositol Monophosphatase Inhibitors: Molecular Design and Synthetic Approach. *Mendeleev Commun.* **2011**, 21, 242–244.

³³ Nagy, M.; Zsuga, M.; Rácz, D.; Kéki, S. Synthesis of Phenanthroline-Terminated Polymers and Their Fe(II)-Complexes. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2010**, 48, 2709–2715.

**Chapitre V : Synthèse de
ligands bispidines de plus
haute denticité et de cages
tricycliques**

1. Ligands pour la complexation des lanthanides

Comme expliqué précédemment, les bispidines sont des macrocycles particulièrement adaptés à la complexation de métaux de transitions. Il nous a paru intéressant d'étudier la possibilité d'effectuer des modifications structurales sur les ligands bispidines afin de coordonner une autre famille d'éléments chimiques, les lanthanides.

a) Généralités sur les lanthanides

Les lanthanides sont des ions particulièrement intéressants dans le cadre de l'imagerie optique ou encore pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Il existe quinze lanthanides au total, appelés aussi « terres rares ». ¹ Ce sont des éléments de transition du bloc f, qui possèdent la couche $4f$ comme couche de remplissage ² (Tableau 5. 1).

Symbole	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
N° atomique	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
Configuration électronique $Ln^{3+} [Xe]$	$4f^0$	$4f^1$	$4f^2$	$4f^3$	$4f^4$	$4f^5$	$4f^6$	$4f^7$	$4f^8$	$4f^9$	$4f^{10}$	$4f^{11}$	$4f^{12}$	$4f^{13}$	$4f^{14}$

Tableau 5. 1: Famille des lanthanides et configuration électronique de la dernière couche des ions Ln^{3+} .

Les lanthanides présentent des propriétés magnétiques intéressantes dues à la présence d'électrons $4f$ célibataires ou partiellement appariés qui les rendent fortement paramagnétiques (à l'exception du lanthane et du lutétium). Le gadolinium(III) présente un spin de $7/2$ associé à un temps de relaxation électronique long qui fait de lui un ion très utilisé dans le cadre du développement de nouveaux agents de contraste pour l'IRM. ³

D'autre part les lanthanides possèdent des propriétés spectroscopiques particulièrement intéressantes. En effet, leur luminescence résulte de transitions électroniques internes $4f - 4f$ ou $f-d$. ⁴ Le terbium(III) et l'euporium(III) présentent des caractéristiques intéressantes dans le domaine du visible, à savoir, des temps de vie longs (quelques millisecondes), permettant une étude de la luminescence en temps résolu, et des rendements quantiques élevés. Une discrimination spectrale du complexe de lanthanide est possible par rapport aux autres signaux de fluorescence (celle du milieu biologique par exemple) avec un bon rapport signal sur bruit (Figure 5. 1). Dans le cadre de l'analyse et du diagnostic biomédical, ces lanthanides sont les plus utilisés comme sondes luminescentes. ^{5,6}

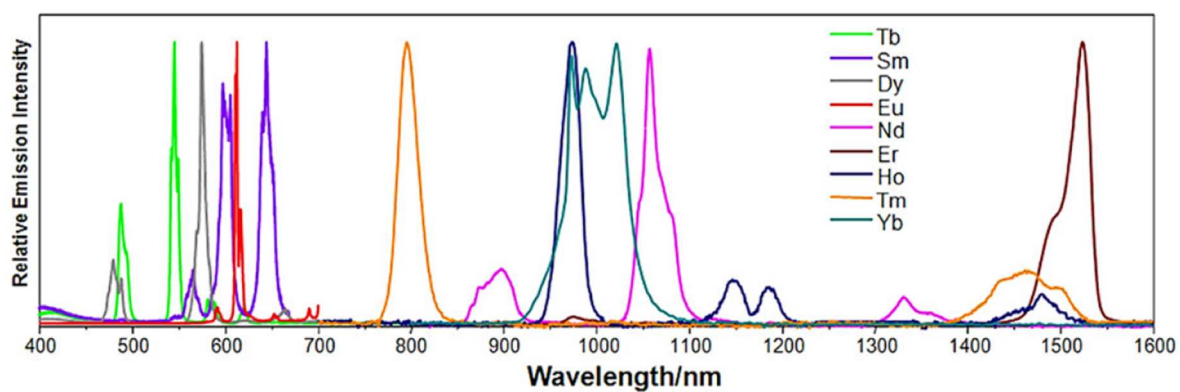


Figure 5. 1: Spectres d'émission des ions lanthanides en solution.^{7,8}

Afin de pouvoir complexer de manière optimale ces ions, il est nécessaire d'augmenter le nombre d'atomes coordinants présents sur le squelette bispidine. En effet, les complexes de lanthanides présentent un nombre de coordination compris entre 8 et 10 en solution. De plus, ils sont classés comme des acides durs selon la théorie de Pearson.⁹ Ils vont donc avoir une bonne affinité pour les atomes donneurs durs tels que l'oxygène ou le fluor.

b) Précurseurs

Dans cette optique de complexation des ions lanthanides, deux nouveaux précurseurs comportant quatre atomes coordinants chacun ont été synthétisés à partir des aldéhydes correspondants.

i. Précurseur P₄

Le premier d'entre eux, le précurseur P₄, possède des entités hydroxyquinoléines. Ces motifs sont des antennes pour les ions lanthanides, notamment pour l'erbium(III).¹⁰ L'aldéhyde correspondant a été synthétisé à partir de l'hydroxyquinaldine par oxydation du méthyl par le dioxyde de sélénium (Schéma 5. 1).¹¹

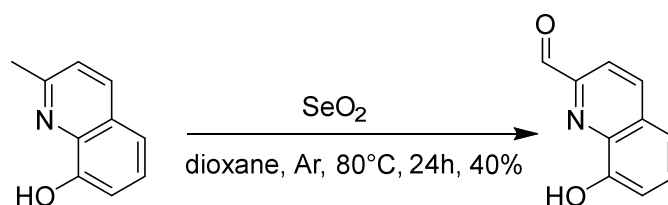


Schéma 5. 1: Synthèse de la 8-hydroxyquinaldine.

Le précurseur P₄ a ensuite été synthétisé à partir de deux équivalents de cet aldéhyde selon les conditions décrites précédemment¹² (chap. II) (Schéma 5. 2).

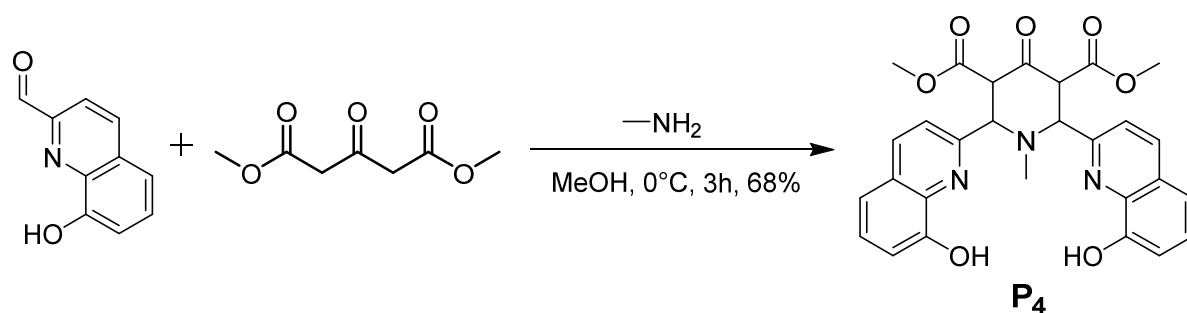


Schéma 5. 2: Synthèse du précurseur P_4 .

Le précurseur P_4 a été isolé sous la forme d'un solide puis purifié par solubilisation partielle à chaud dans le méthanol et filtration à froid pour donner un mélange de plusieurs isomères (*cis* ou *trans* cétone + *cis* ou *trans* éno). Une deuxième synthèse, réalisée dans des conditions identiques mais avec une filtration à chaud immédiatement après la solubilisation partielle dans le méthanol, nous a permis d'obtenir sélectivement la forme *cis*-cétone (Figure 5. 2).

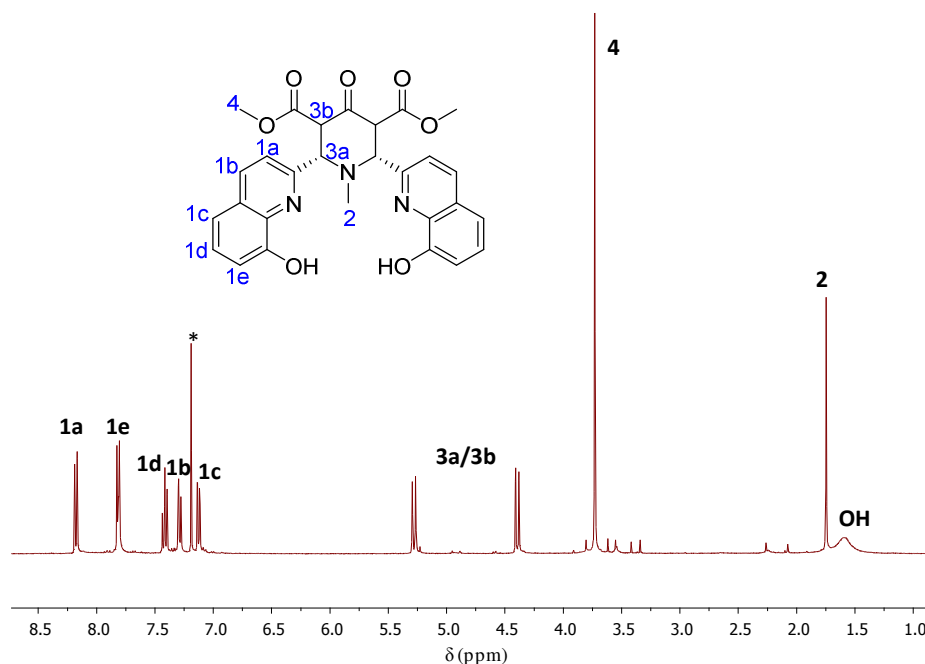


Figure 5. 2: Spectre RMN 1H du précurseur P_4 (400 MHz, *CDCl_3).

Le spectre RMN du proton indique l'obtention d'une espèce symétrique. En effet, la présence d'un seul signal (système AB) pour les protons $H_{3a/3b}$ ainsi que l'absence de pic énoïque montrent bien l'obtention de la configuration *cis*-cétone exclusivement. Un mélange de produits a été obtenu et les différentes configurations, possédant des solubilités différentes, peuvent être séparées en fonction des techniques de purification.

Des études de complexation du lutétium(III) par ce précurseur P_4 ont été effectuées. Une étude par RMN du proton a été réalisée en présence d'un équivalent de $LuCl_3 \cdot 6H_2O$ (Figure 5. 3).

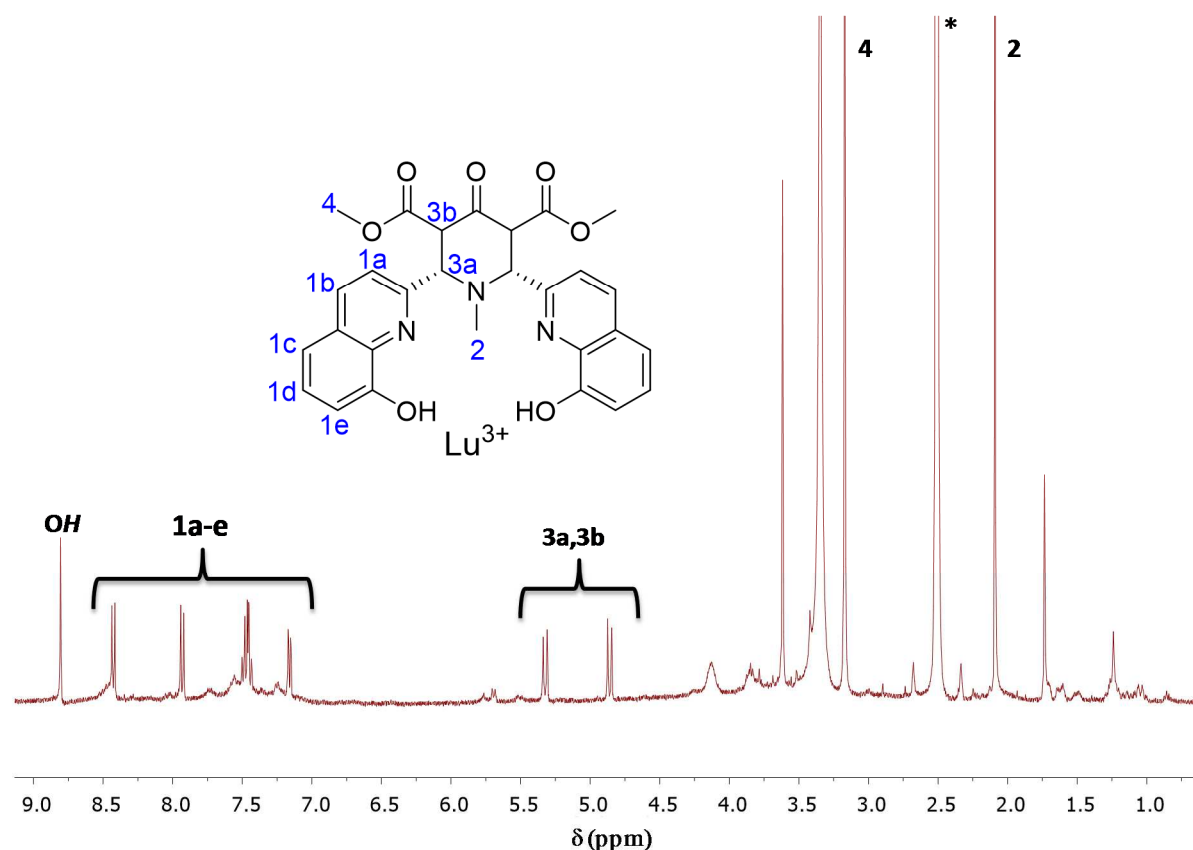


Figure 5. 3: Spectre RMN 1H du précurseur P_4 en présence de lutétium(III) (1 éq.) (400 MHz, d_6 -DMSO).

Les signaux obtenus indiquent l'obtention d'une espèce majoritaire différente du précurseur de départ. Ceci peut être attribué en partie au changement de solvant deutéré. Cependant, nous pouvons raisonnablement penser qu'une complexation du lutétium(III) s'effectue car le milieu réactionnel n'est plus du tout soluble dans $CDCl_3$. Sachant qu'aucune base n'a été rajoutée dans le milieu, les fonctions alcools sont probablement sous forme protonée ce qui ne favorise pas la complexation. Il est cependant envisageable que l'on forme un complexe dimérique (ligand : métal = 2:1).¹⁰ La formation de cette espèce $Lu(P_4)_2$ serait en accord avec la différence de solubilité observée.

D'autre part, une étude spectrofluorimétrique a été effectuée afin de confirmer cette interaction forte entre le précurseur P_4 et le lanthanide. Pour ce suivi de complexation, l'euprium(III) a été utilisé en raison de ses raies caractéristiques observées en fluorescence lorsqu'il est complexé.¹³ Des spectres du précurseur seul puis après ajout de l'euprium(III) ont été réalisés (Figure 5. 4).

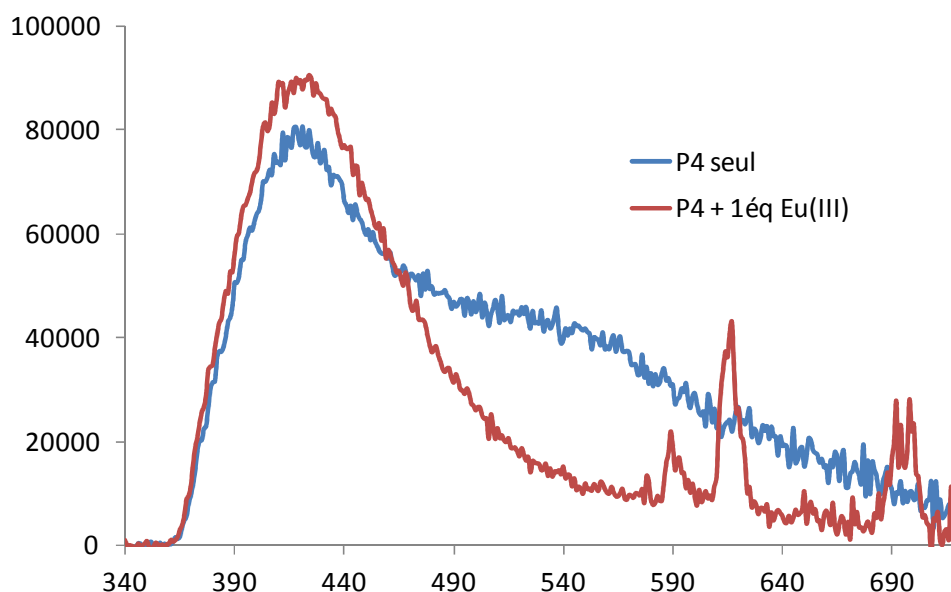


Figure 5. 4: Spectres de fluorescence du précurseur P_4 sans (bleu) et avec $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 éq.) (rouge). Solvant: DMSO, $[P_4]_i = [\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]_{aj} = 3,17 \times 10^{-4} \text{ M}$, $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$.

Des différences significatives sont observées entre les deux spectres. Le spectre du précurseur seul présente des bandes caractéristiques de l'état singulet à 420 nm et de l'état triplet de l'hydroxyquinoléine vers 540 nm, qui disparaît lors de l'ajout du lanthanide, à cause du transfert d'énergie s'effectuant entre les deux entités. Entre 600 et 700 nm, les raies caractéristiques des transitions $^5D_0 - ^7F_J$ ($J=0-4$) de l'euprium sont bien présentes lorsque celui-ci est ajouté dans le milieu. Ceci est en accord avec une complexation de ce dernier par le précurseur P_4 ainsi qu'avec une sensibilisation de l'euprium(III) par l'hydroxyquinoléine, même si le rendement quantique attendu est assez faible.¹⁴ Le temps de vie calculé pour cette espèce est de 1,33 ms dans le DMSO. Au vu de ces résultats, il nous est possible de poursuivre dans cette voie avec l'étude de la complexation d'autres lanthanides émettant dans le proche infrarouge (Er, Yb, Nd).

ii. Précurseur P_5

Un deuxième précurseur comportant quatre atomes coordinants a également été obtenu. Un nouveau synthon aldéhyde a été synthétisé à partir de l'ester méthylique de la 2,6-hydroxyméthylpyridine (obtenue en deux étapes à partir de l'acide dipicolinique)¹⁵ selon les conditions décrites dans la littérature¹⁶ (Schéma 5. 3).

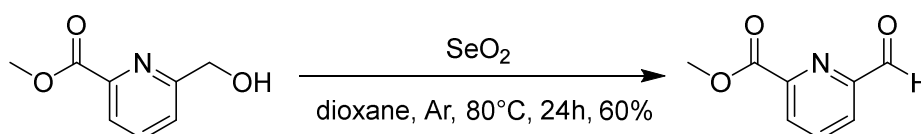


Schéma 5. 3: Synthèse de l'aldéhyde picolinate.

Deux équivalents de cet aldéhyde ont ensuite permis la synthèse du précurseur P₅, en présence de l'ester oxoglutarate de méthyl et de la méthylamine (Schéma 5. 4).

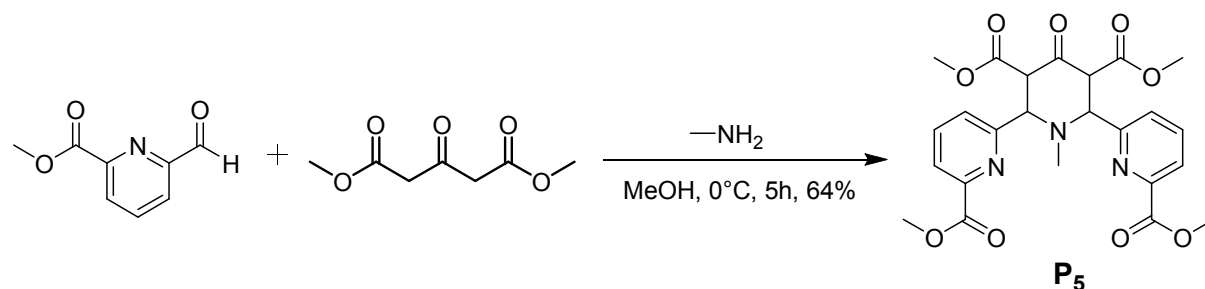


Schéma 5. 4: Synthèse du précurseur P₅.

Le composé obtenu est purifié par recristallisation dans le méthanol sous la forme d'un mélange *trans*-énol (majoritaire) et de *cis/trans*-cétone (minoritaires) (88/12) (Figure 5. 5).

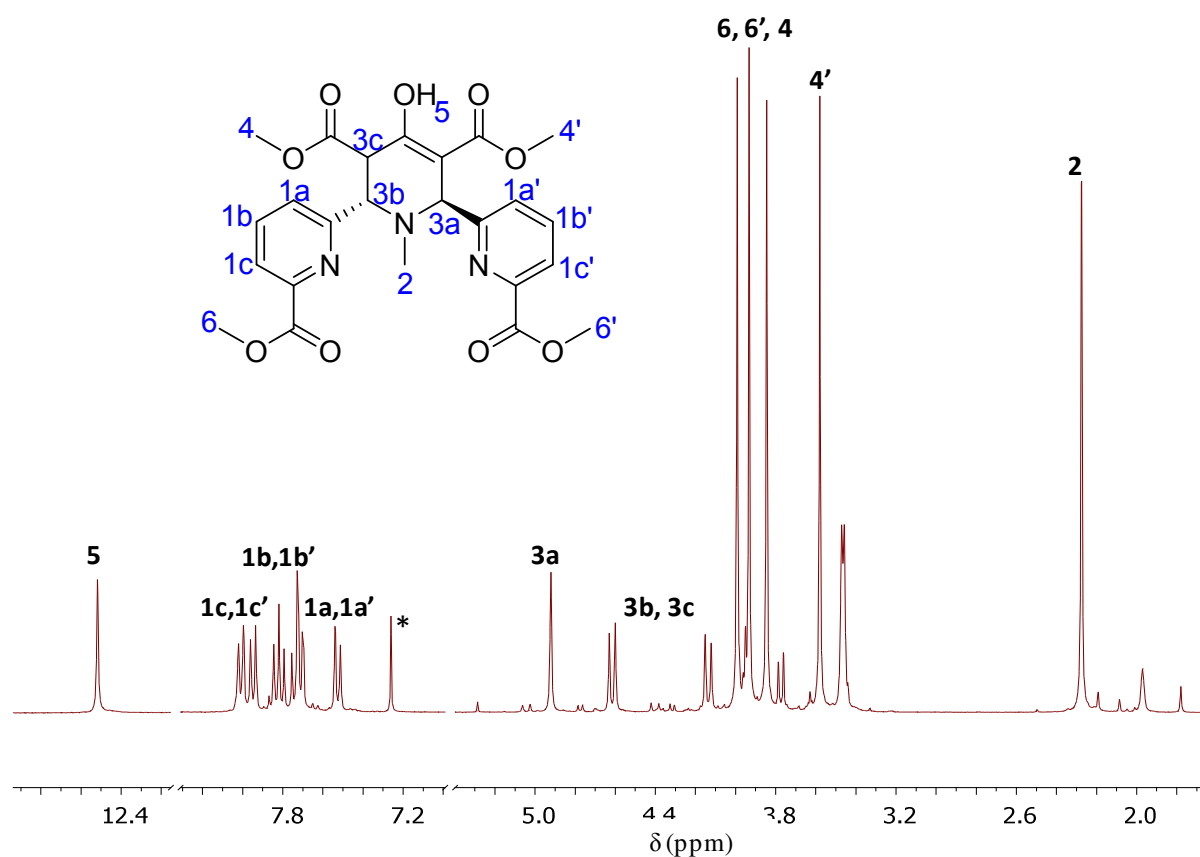


Figure 5. 5: Spectre RMN ¹H du précurseur P₅ (300 MHz, *CDCl₃).

Le spectre RMN ¹H montre bien l'obtention d'une espèce majoritaire dissymétrique puisque les signaux sont dédoublés. La présence de la forme énol est confirmée par le signal de H₅ vers 12,5 ppm ainsi que par le motif des signaux H_{3a}, H_{3b} et H_{3c} qui donne un singulet et un système AB.

c) Ligands

La synthèse des ligands à partir de ces deux précurseurs a ensuite été mise en œuvre.

i. Ligand L¹⁸

Le ligand L¹⁸ a été synthétisé à partir du précurseur P₅ dans les mêmes conditions de réaction que celles décrites pour le ligand L¹⁰ (Schéma 5. 5).

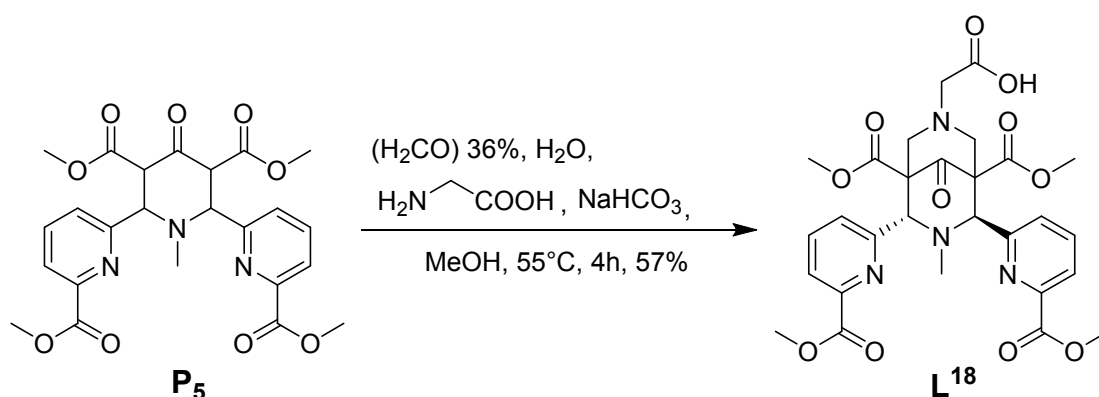


Schéma 5. 5: Synthèse du ligand L¹⁸.

Lors de la synthèse, un précipité blanc se forme à chaud. Celui-ci est ensuite filtré et rincé avec du méthanol froid, et le ligand L¹⁸ est obtenu pur. Cependant, les groupements picolinates sont en configuration *trans* exclusivement (Figure 5. 6).

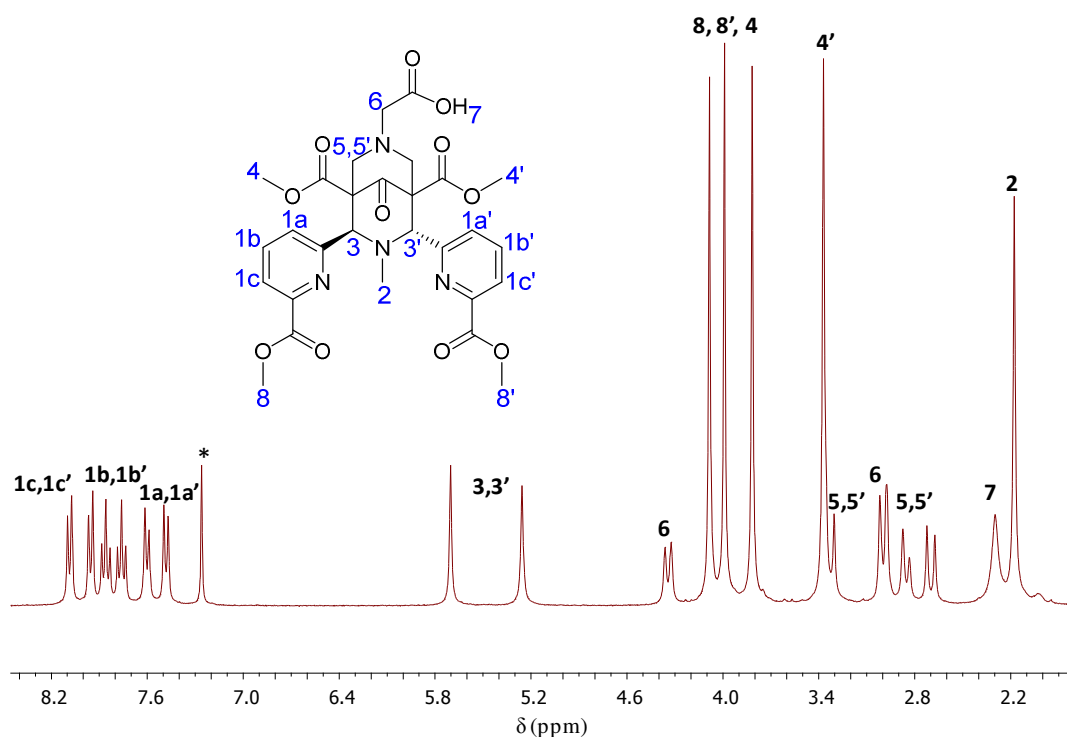


Figure 5. 6: Spectre RMN ¹H du ligand L¹⁸ *trans* (300 MHz, *CDCl₃).

Le dédoublement de l'ensemble des signaux (excepté H₂, H₆ et H₇) démontrent l'obtention d'une espèce dissymétrique, en accord avec le précurseur *trans*, qui correspond au ligand dans une configuration *trans*.¹²

Comme expliqué précédemment, la configuration *trans* des ligands bispidines n'est pas une configuration optimale dans le cadre de la complexation d'ions métalliques (métaux de transition et lanthanides). Un essai de complexation du lutétium(III) a tout de même été tenté et suivi par RMN ¹H (Figure 5. 7).

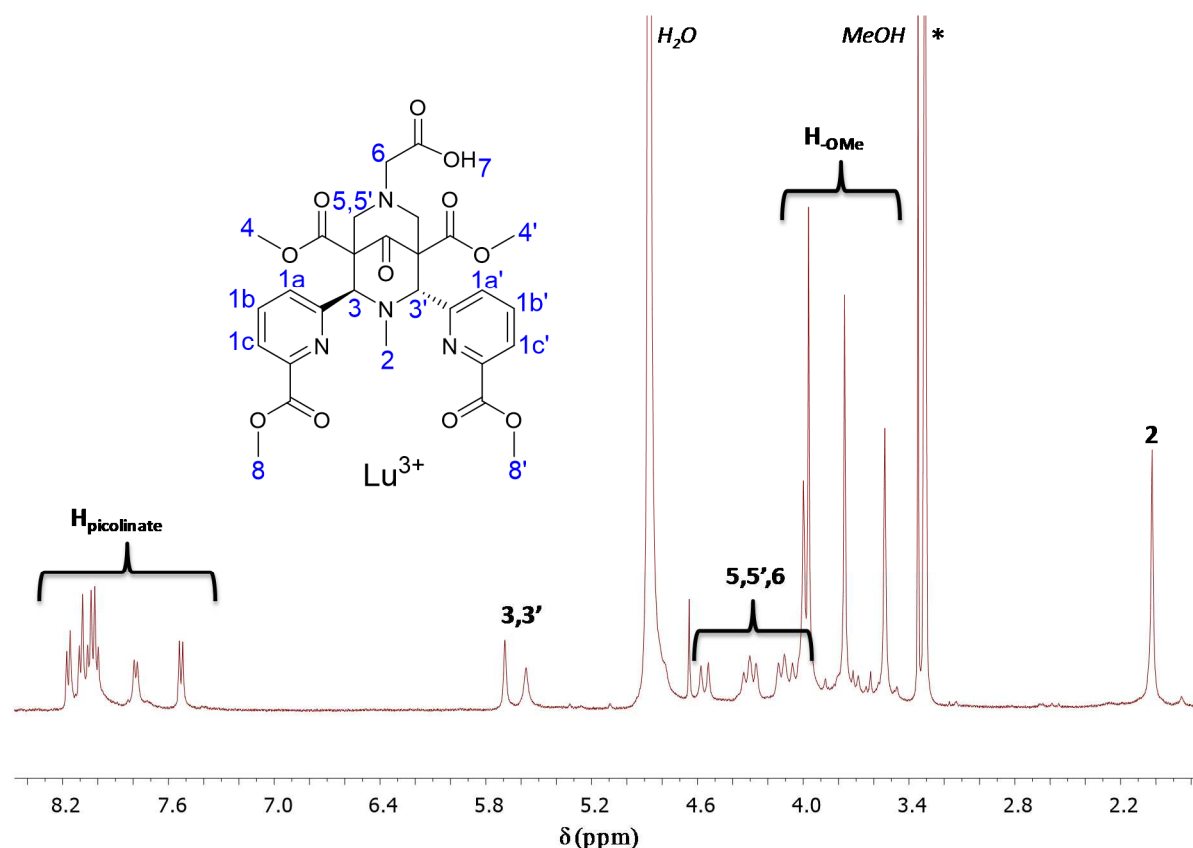


Figure 5. 7: Spectre RMN ¹H du ligand L¹⁸ en présence de LuCl₃·6H₂O (1 éq.) (400 MHz, *CD₃OD).

D'après ce spectre, une espèce majoritaire est présente et des différences de déplacements chimiques des signaux sont observées. Il semblerait qu'il y ait une certaine interaction qui se produise entre le lutétium(III) et le ligand L¹⁸. Une complexation serait envisageable malgré la présence de seulement cinq atomes coordinants due à la configuration *trans* du ligand.

Il est donc nécessaire de trouver d'autres conditions réactionnelles afin d'obtenir ce ligand (et le précurseur) dans des configurations majoritairement *cis* et non *trans*. Des essais de synthèse d'un nouveau précurseur ont été réalisés. Afin de favoriser la configuration *cis*, nous avons décidé de diminuer l'encombrement stérique sur les pyridines en hydrolysant ses esters

méthyliques avant la formation du précurseur. Malheureusement, l'aldéhyde correspondant n'a pu être obtenu et la synthèse du précurseur n'a donc pas été tentée.

ii. **Ligand L²⁹**

Pour le deuxième ligand, le précurseur P₄ avait été isolé sous la forme *cis*-cétone exclusivement. Le résultat attendu de la deuxième étape (formation du ligand bispidone) était donc l'obtention d'un ligand en configuration *cis* également. Plusieurs essais de synthèse ont été tentés, le premier dans les conditions habituelles (Schéma 5. 6).

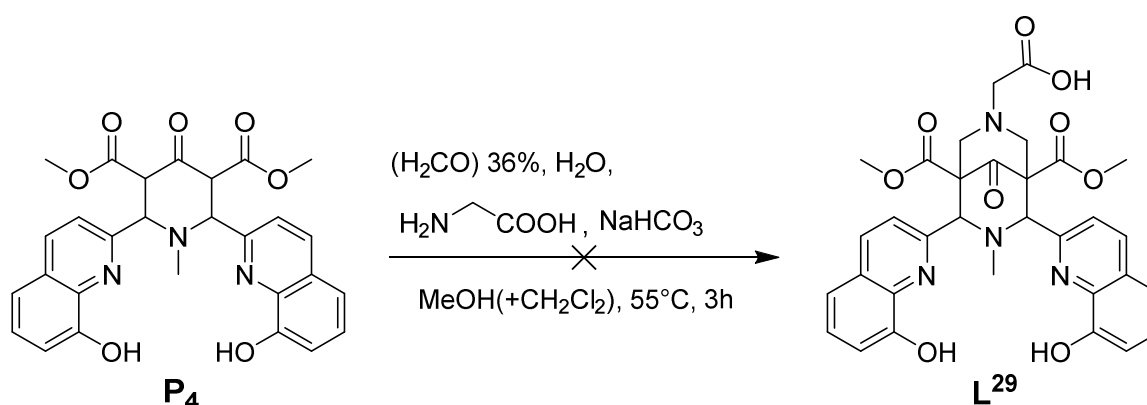


Schéma 5. 6: Essai de synthèse du ligand L²⁹ dans le méthanol.

Le produit isolé par filtration est le précurseur de départ, la réaction n'a donc pas fonctionné. Cependant, une mauvaise solubilité du produit de départ avait été observée et les conditions de réaction ont été modifiées afin de résoudre ce problème. Un deuxième essai a été réalisé dans le tétrahydrofurane (THF), mais la solubilité ne s'est pas améliorée. Un dernier essai a donc été effectué dans la DMF. Dans ce solvant, la solubilité du composé est bien meilleure mais la vitesse de réaction semble assez lente au vu du suivi de l'avancement par CCM. Aucun cristal n'a pu être obtenu, et après une extraction eau/diéthyle éther, il semblerait qu'une forme symétrique majoritaire différente du précurseur soit observée (Figure 5. 8).

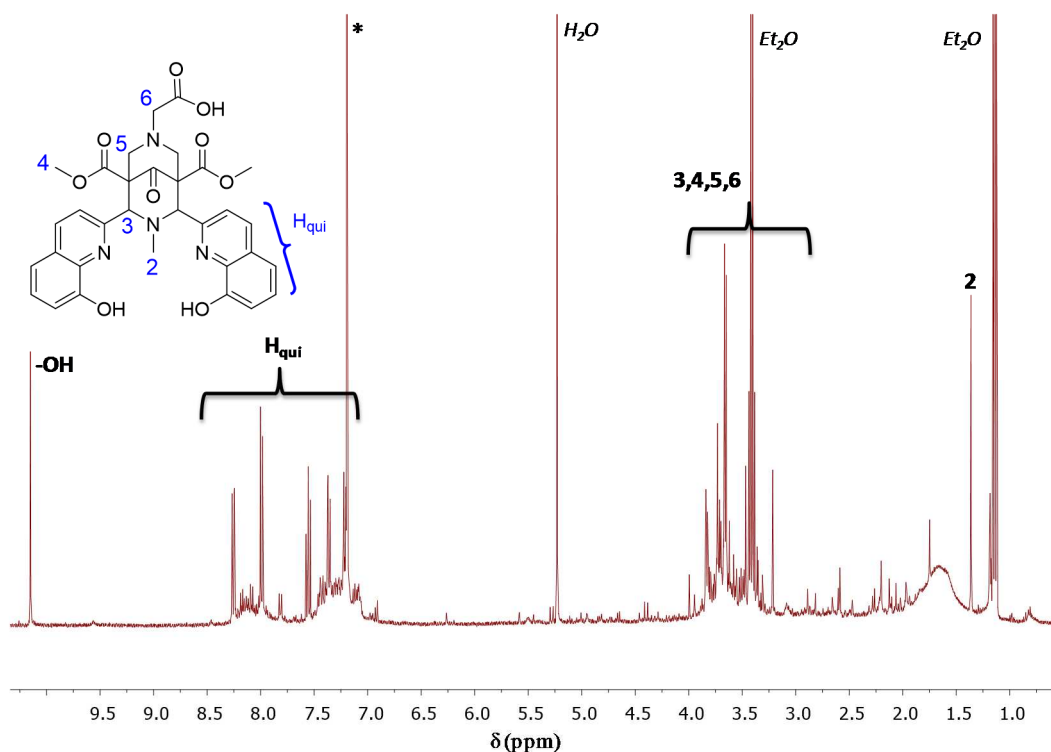


Figure 5. 8: Spectre RMN ¹H du ligand L²⁹ impur (400 MHz, *CDCl₃).

En effet, aucun pic majoritaire n'est observé dans la région de 4,5-5 ppm, il ne reste donc quasiment pas de précurseur de départ. De plus, les signaux caractéristiques de la bispidine attendue sont présents. Le ligand L²⁹ n'a donc pu être obtenu pur suite aux essais d'extraction et de cristallisation mais un isomère majoritaire est formé. Des conditions d'optimisation de la synthèse restent à être mises en place.

2. Cages tricycliques

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'une nouvelle famille de bispidones : les cages tricycliques. Le but est d'augmenter la sélectivité pour le métal (ici le cuivre(II)) par rapport aux autres métaux de transition voisins. Ceci pourrait être possible en faisant varier la taille du troisième cycle suivant le rayon du métal ciblé (Figure 5. 9).

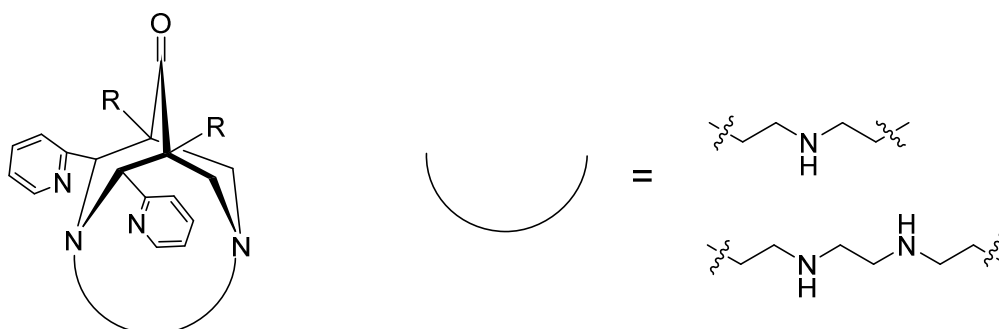


Figure 5. 9: Structure de base des ligands tricycliques de types bispidines.

Une telle sélectivité de l'ion cuivre dans le cadre de l'imagerie TEP pourrait permettre de s'affranchir de la purification du cuivre 64 lors de sa production.¹⁷

a) Précurseur P₆

Dans le cadre de la synthèse de nouvelles cages tricycliques de types bispidines pour la complexation, un autre précurseur a été utilisé (P₆). Celui-ci a déjà été décrit dans la littérature¹⁸ et possède simplement un hydrogène comme groupement en position R₁ (Figure 5. 10).

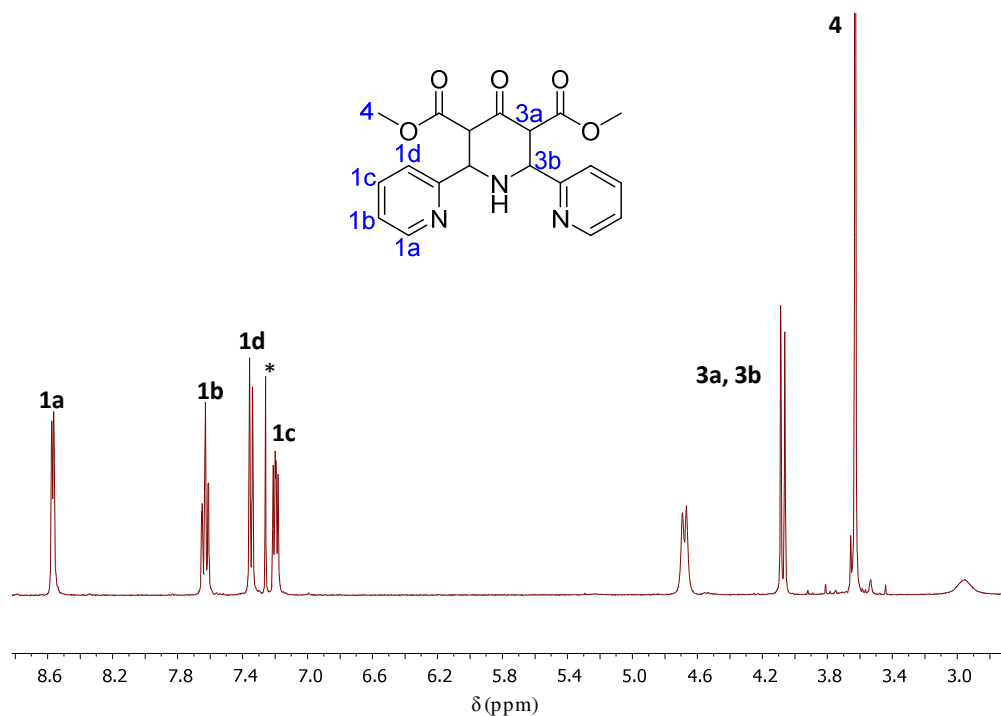


Figure 5. 10: Spectre RMN ¹H du précurseur P₆ (400 MHz, *CDCl₃).

Celui-ci est bien symétrique car aucun dédoublement des signaux n'est observé, et est isolé sélectivement sous la configuration *cis*-cétone.

b) Bispidines

i. Ligand L¹⁷

La voie de synthèse utilisée pour l'obtention du ligand L¹⁷ a été initialement pensée dans le but d'obtenir un ligand possédant deux groupements NH qui auraient pu être alkylés par la suite (L³⁰) (Schéma 5. 7).

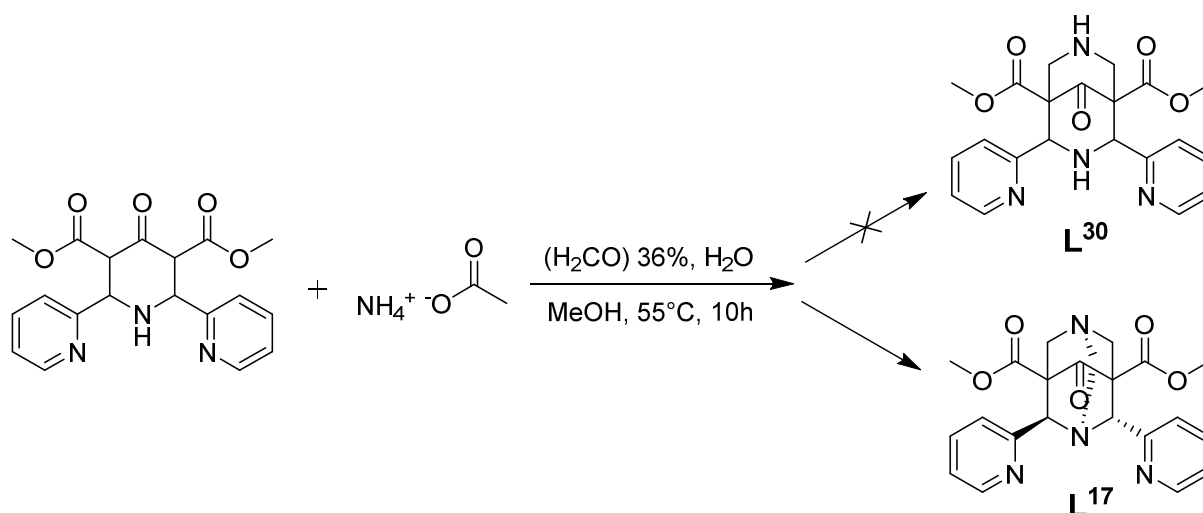


Schéma 5. 7: Synthèse du ligand L¹⁷.

Cependant, dans ces conditions de synthèse, l'espèce majoritairement isolée est une molécule tricyclique (L¹⁷)¹⁹ (Schéma 5. 7) dans laquelle les deux atomes d'azote tertiaires sont pontés par un CH₂. Ceci a pu être mis en évidence grâce aux spectres RMN ¹H et ¹³C (Figure 5. 11), ainsi qu'avec la spectrométrie de masse ($m/z = 445,15 [M+H]^+$).

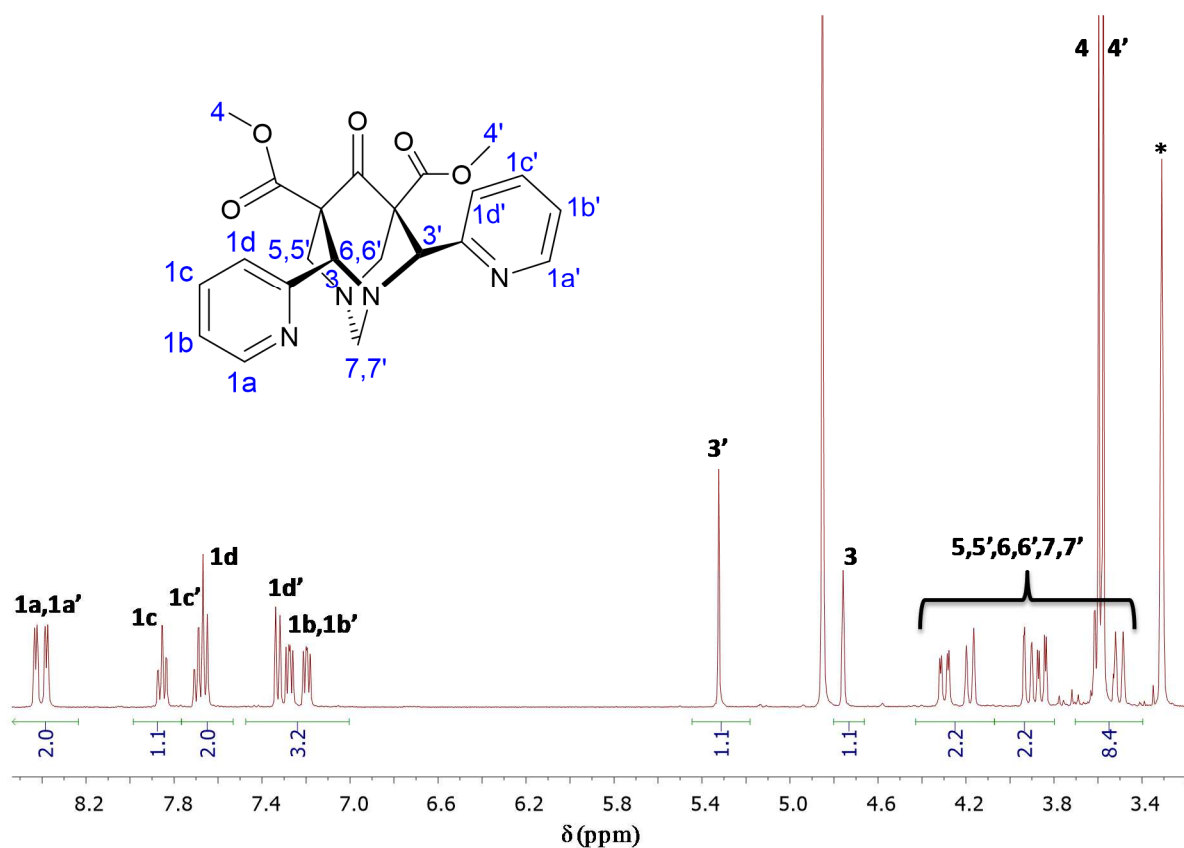


Figure 5. 11: Spectre RMN ¹H du ligand L¹⁷ (400 MHz, *CD₃OD).

Les spectres RMN 2D HSQC et COSY ont permis de mettre en évidence la présence de trois systèmes AB correspondant aux protons H_{5,5'}, H_{6,6'} et H_{7,7'} (Figure 5. 12).

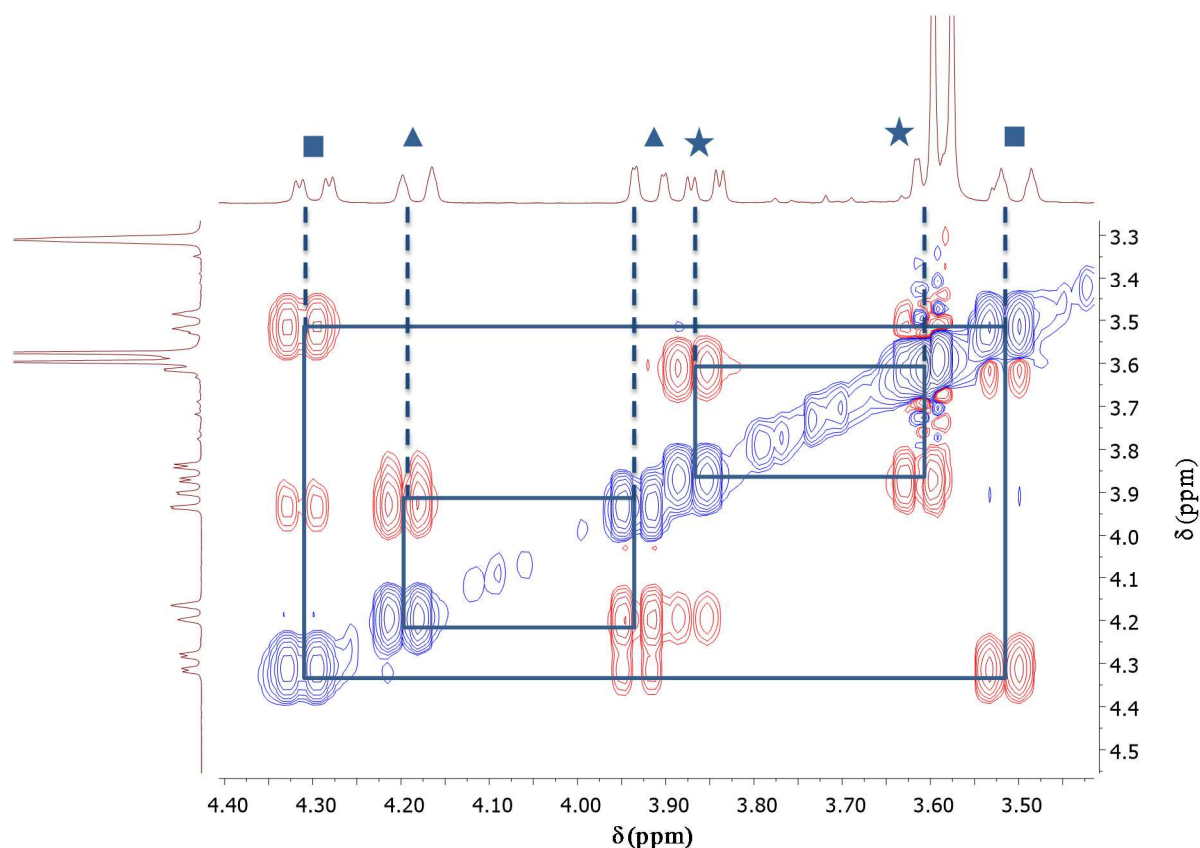


Figure 5. 12: Spectre RMN 2D COSY H-H du ligand L^{17} (400 MHz, CD_3OD) et corrélation entre les 3 systèmes AB (5, 5', 6, 6', 7 et 7').

Ces études RMN nous ont permis de confirmer que le ligand L^{17} obtenu n'était pas symétrique, et qu'il se trouvait bien en configuration *trans*. Ceci a été confirmé par la structure cristallographique obtenue (Rennes, ISC, coll. Dr Franck Camerel) (Figure 5. 13).

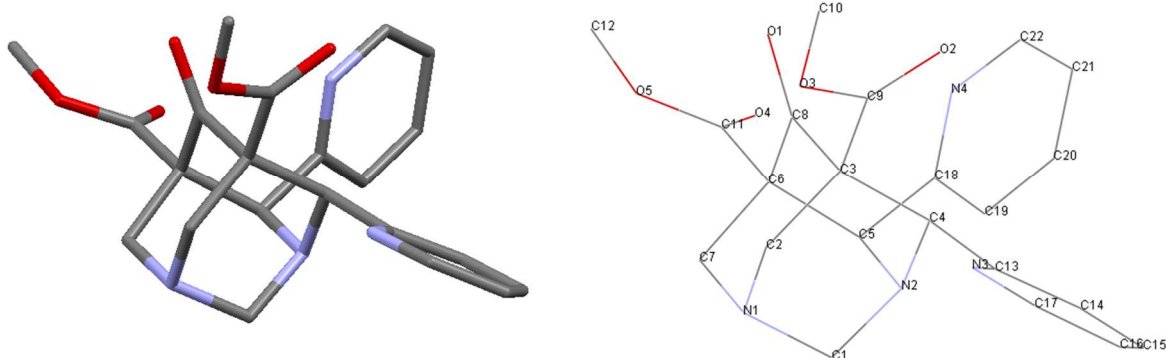


Figure 5. 13: Structure cristallographique du ligand L^{17} en configuration *trans*.

Le composé cristallise selon le groupe d'espace $P_{21/n}$. Le ligand possède bien une cage tricyclique, mais celle-ci ne semble pas optimale pour la complexation des métaux à cause de la configuration *trans* des groupements pyridines. En effet, le nombre d'atomes coordinants est réduit à trois au niveau de la cage.

Des essais de complexation avec un équivalent de zinc(II) ont été tentés et suivis par RMN 1D et 2D (Figure 5. 14).

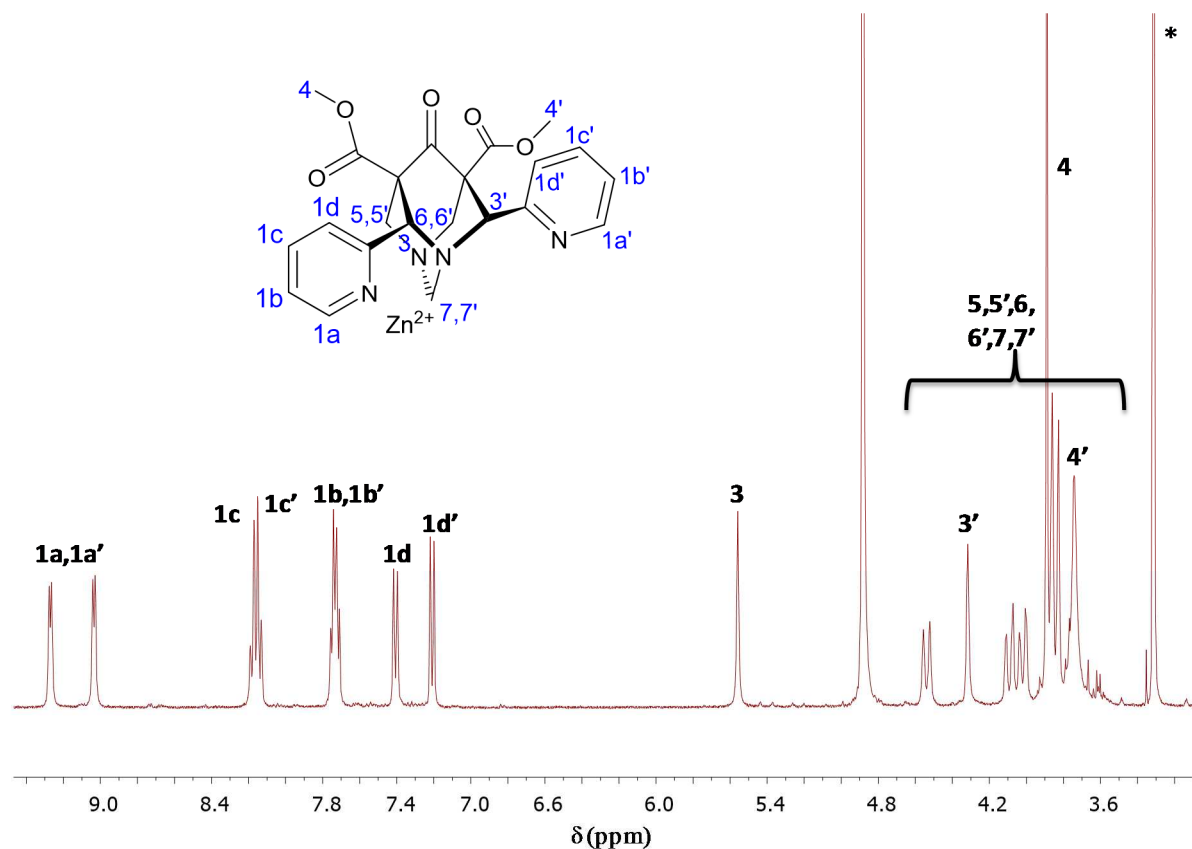


Figure 5. 14: Spectre RMN ^1H du ligand L^{17} en présence d'un équivalent de ZnCl_2 (400 MHz, $^*\text{CD}_3\text{OD}$).

Les protons $\text{H}_{1a/1a'}$ se retrouvent déblindés, tout comme les protons $\text{H}_{1c/1c'}$ et H_3 . D'autre part, les protons $\text{H}_{1b/1b'}$ sont plus blindés ainsi que le proton H_3 . Ces modifications des signaux semblent indiquer la complexation du zinc(II) par les unités pyridiniques. En effet, d'après les couplages observés en RMN 2D NOESY, le motif pyridine en position axiale a effectué une rotation en présence du métal, car le proton H_{1d} ne présente pas de couplage avec les trois CH_2 ($\text{H}_{5,5'}$ (*2) et H_6) ce qui indique une interaction entre cette pyridine et le métal. De plus, au vu de la dissymétrie observée des signaux, le ligand est toujours en configuration *trans*.

Pour conclure sur la bispidone L^{17} , nous avons synthétisé un ligand tricyclique qui a pu être entièrement caractérisé et dont les propriétés de complexation semblent intéressantes à étudier.

Pour ce qui est de l'obtention du ligand L^{30} prévu initialement, un autre essai en présence de deux équivalents de formaldéhyde au lieu de trois a été réalisé afin d'éviter la formation du troisième cycle, mais sans succès. Une autre voie de synthèse envisageable serait celle décrite par le groupe de Hasserodt (chap. I) (Schéma 5. 8).

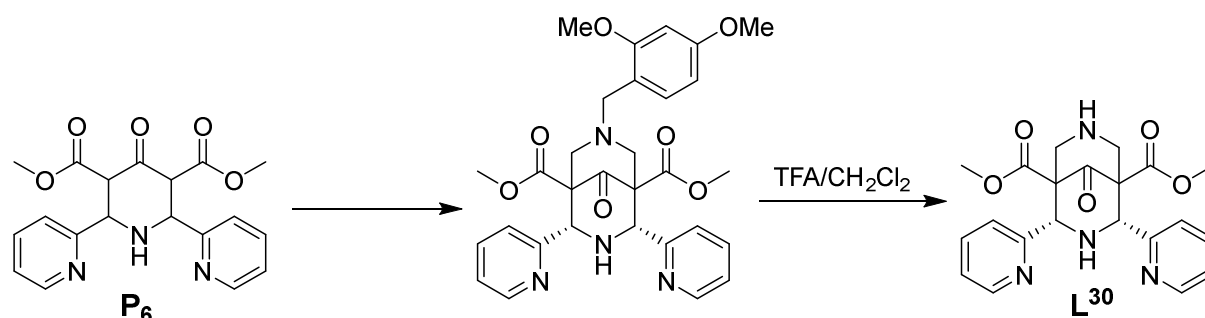


Schéma 5. 8: Voie de synthèse inspirée d'Hasserodt et coll. pour l'obtention du ligand L³⁰.

De nouvelles conditions doivent donc être mises au point afin d'obtenir ce ligand « bis-NH » qui, via la N-alkylation, permettrait l'insertion de chaînes de longueurs différentes entre les deux amines tertiaires. Ainsi nous pourrions obtenir une nouvelle famille de bispidines tricycliques.

ii. Ligand L¹⁹

Suite à la non-obtention du ligand L³⁰, une autre voie de synthèse a alors été mise au point. Toujours en partant du précurseur P₆, la formation d'une nouvelle bispidone via une diamine monoprotégée par un groupement Boc a été effectuée (Schéma 5. 9).

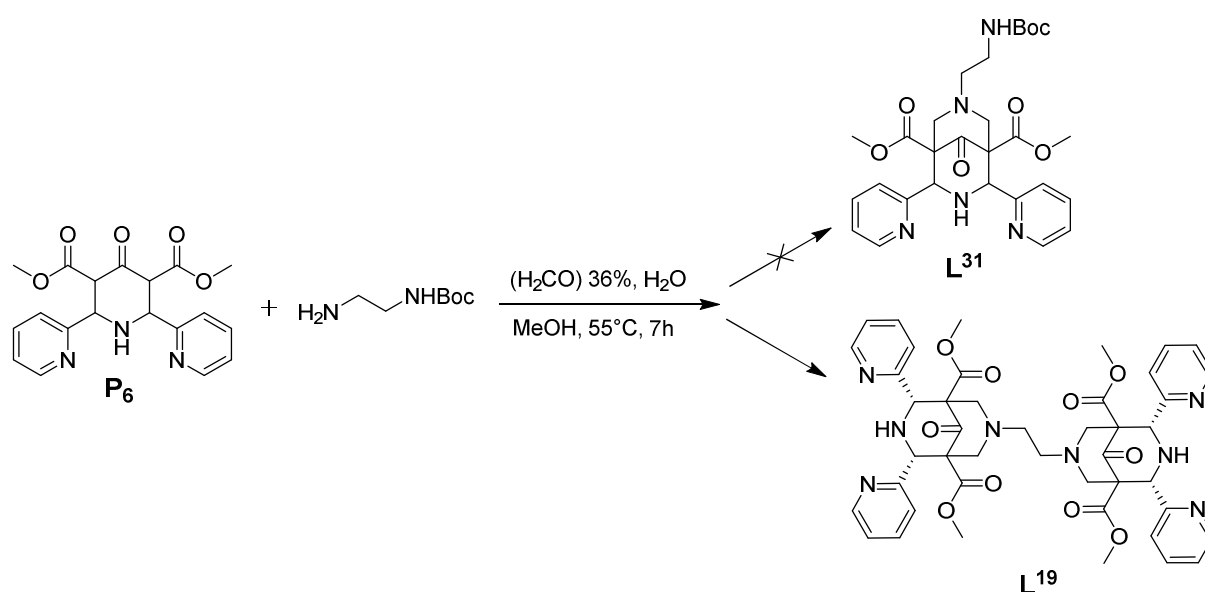


Schéma 5. 9: Synthèse du ligand L¹⁹.

Une nouvelle fois, le produit isolé n'a pas été le produit attendu. En effet, le ligand L³¹ était celui attendu mais ce dernier n'a pu être caractérisé. Le ligand L¹⁹ a, quant à lui, été obtenu après précipitation dans le milieu réactionnel à température ambiante. La formation du composé en faible quantité (2,6% de rendement) semble être due à une faible proportion de diamine non-

protégée présente au départ. La bis-bispidone L^{19} a quand même pu être caractérisée par RMN (Figure 5. 15).

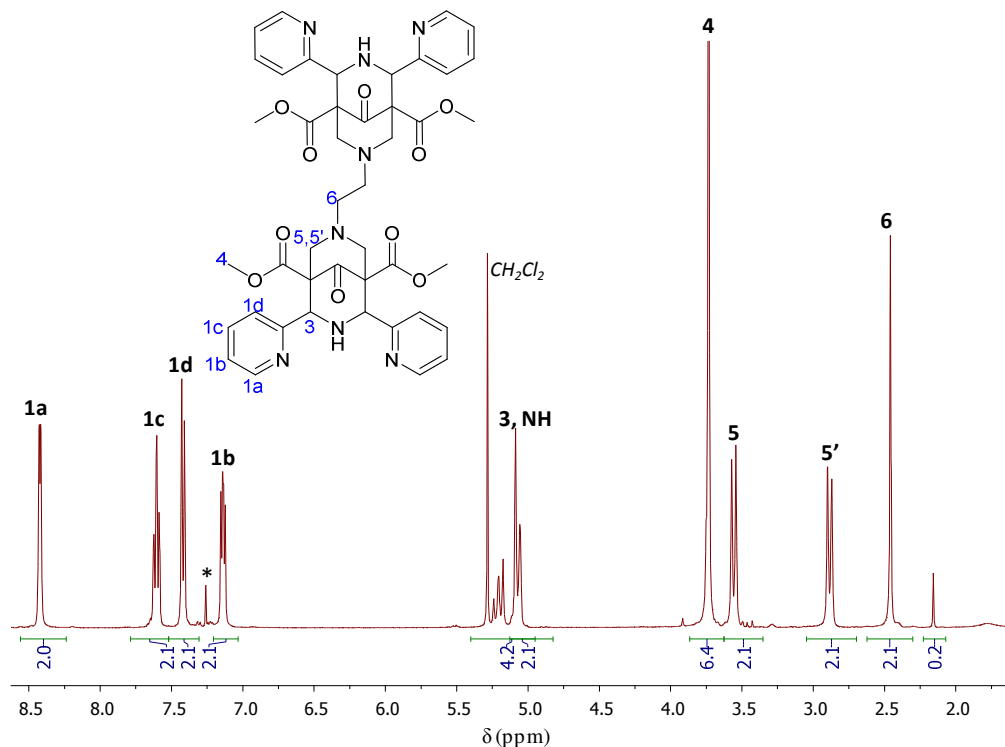


Figure 5. 15: Spectre RMN 1H du ligand L^{19} (400 MHz, *CDCl_3).

Par rapport au ligand L^{31} attendu, nous remarquons l'absence des signaux correspondants pour la chaîne NHBoc et la présence d'un seul CH_2 supplémentaire par molécule de bispidone. Vers 5 ppm, on peut constater la présence d'un système AX_2 entre les protons NH et $H_{3,3}$. L'obtention d'une seule famille de signaux indique que le ligand L^{19} est bien un ligand symétrique avec les motifs pyridines en *cis*. Le spectre RMN 2D NOESY indique un couplage entre $H_{5,5'}$ et H_6 , ce qui est en accord avec la proximité des trois CH_2 dans la bis-bispidone (Figure 5. 16).

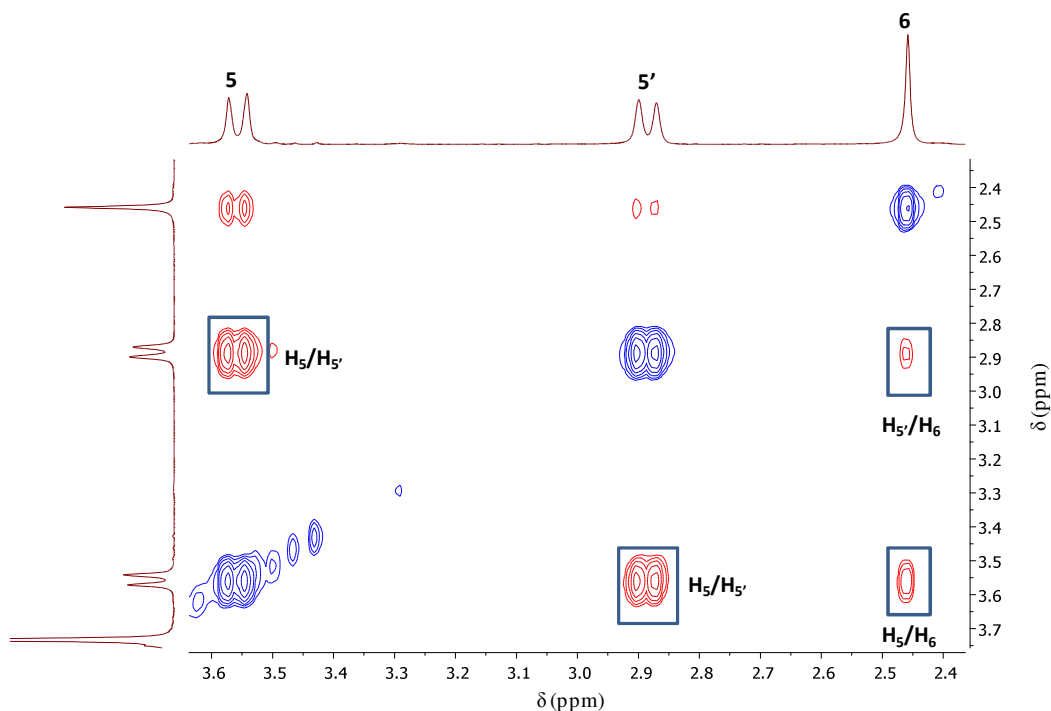


Figure 5. 16: Spectre RMN 2D NOESY du ligand L^{19} (400 MHz, $CDCl_3$).

Des ajouts de un et deux équivalents de zinc(II) ont ensuite été effectués afin d'étudier le comportement de la bis-bispidone L^{19} en présence d'un métal par RMN 1H (Figure 5. 17).

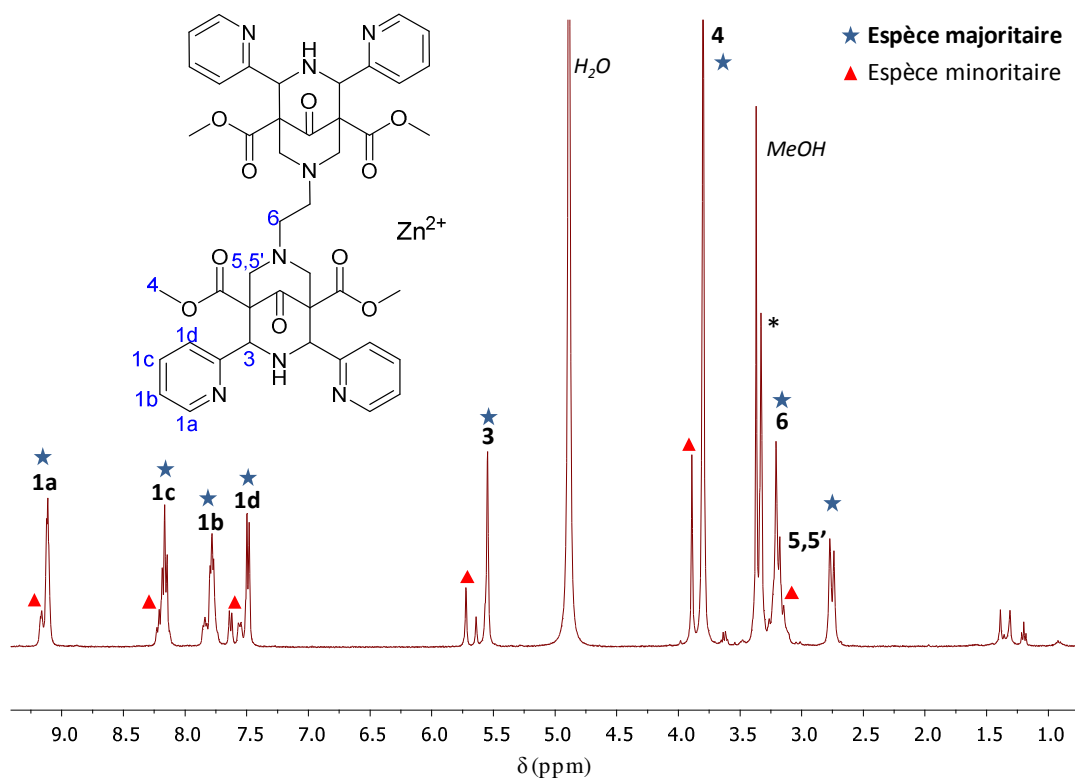


Figure 5. 17: Spectre RMN 1H du ligand L^{19} en présence de 1 ou 2 équivalents de $ZnCl_2$ (400 MHz, $*CD_3OD$).

L'ajout de un ou deux équivalents de zinc(II) donne exactement le même spectre RMN mais celui-ci diffère du spectre du ligand libre. Au niveau des pyridines, un déblindage de H_{1a}, H_{1b} et H_{1c} est remarqué, ainsi qu'au niveau des protons H₆. Deux espèces sont présentes et d'après la RMN 2D NOESY, il semblerait que l'on soit en présence d'une espèce majoritaire symétrique et d'une espèce minoritaire asymétrique (Figure 5. 18).

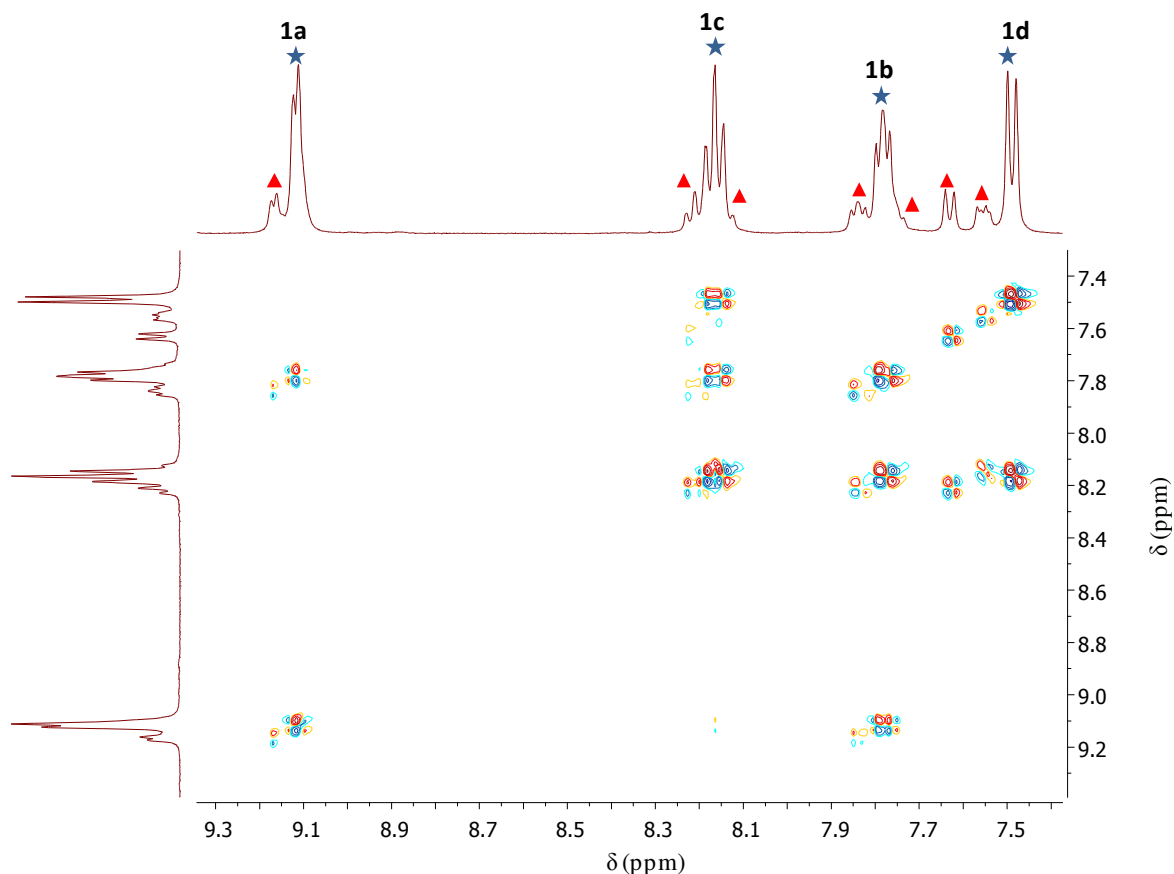


Figure 5. 18: Spectre RMN 2D NOESY du ligand L¹⁹ en présence de deux équivalents de zinc(II) (400 MHz, CD₃OD). Bleu : espèce majoritaire ; rouge : espèce minoritaire.

L'hypothèse proposée pour l'espèce majoritaire obtenue est la suivante (Figure 5. 19).

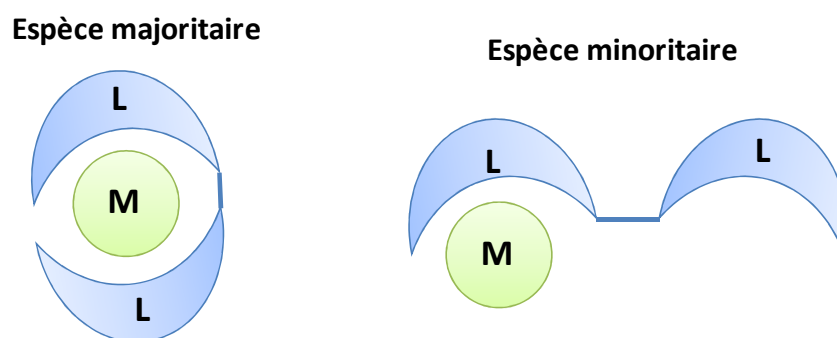


Figure 5. 19: Conformations hypothétiques obtenues en présence de ligand L¹⁹ et de zinc(II).

En effet, au vu des spectres identiques obtenus par ajout de un ou deux équivalents de zinc(II), il semblerait qu'une seule entité bispidone soit complexée par le zinc(II) ou que l'on forme un complexe 2:1 ligand/métal, bien que cela donne 10 atomes coordinants pour le zinc(II) ce qui semble très élevé.

Des études supplémentaires restent à poursuivre afin d'effectuer d'autres analyses sur cette espèce complexée et ainsi de mieux comprendre le comportement de la bis-bispidone en présence de métal.

Une RMN ^1H du filtrat du milieu réactionnel a également été effectuée afin de constater si une autre espèce avait été formée lors de la réaction (Figure 5. 20).

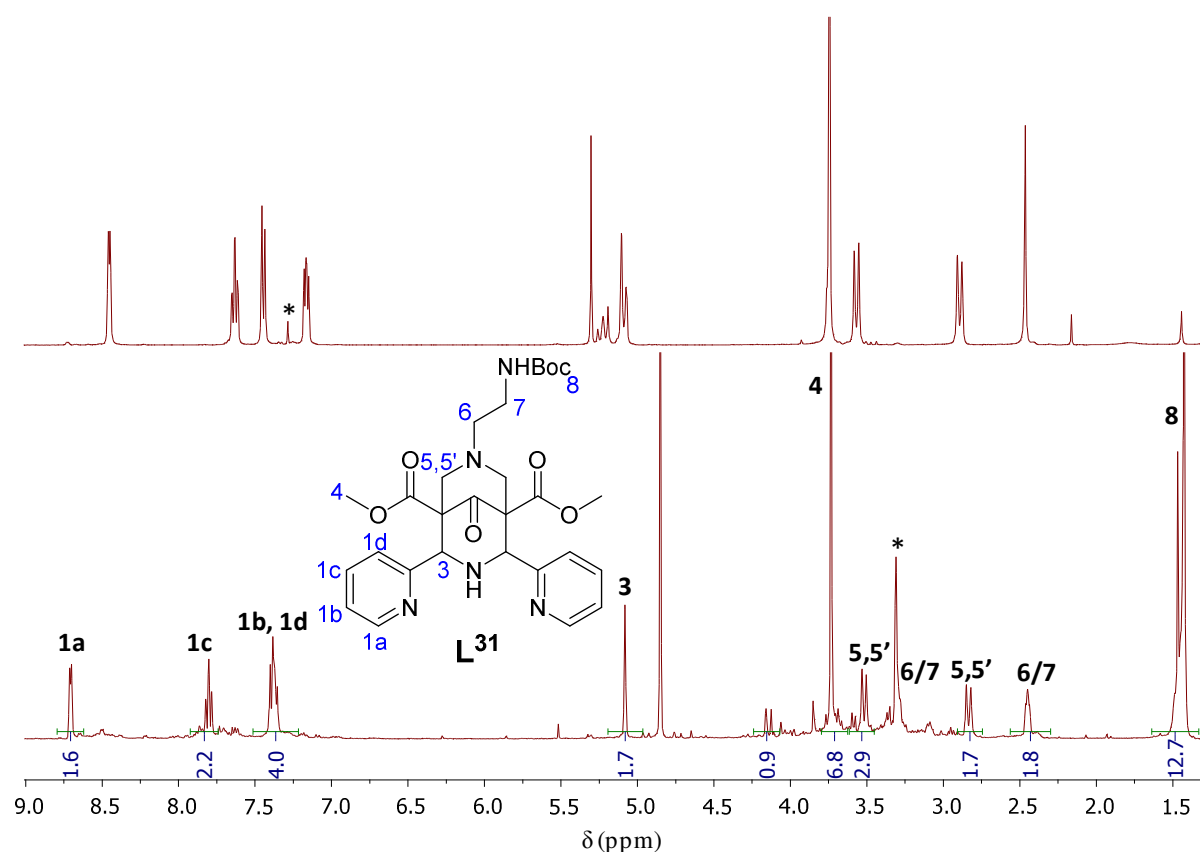


Figure 5. 20: Spectre RMN ^1H du ligand L^{19} (haut, $^*\text{CDCl}_3$, 400 MHz) et du filtrat (bas, $^*\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz).

Au vu de la RMN ^1H obtenue, l'espèce majoritaire présente dans le filtrat diffère du ligand L^{19} . Celui-ci n'est d'ailleurs pas ou peu présent, il correspond donc bien à une espèce secondaire formée lors de la synthèse. L'espèce majoritaire soluble dans le filtrat semble correspondre au ligand L^{31} . La présence des signaux à 1,5 ppm ainsi qu'à 2,4 ppm pourrait indiquer la présence de la chaîne NHBoc sur le ligand (et donc l'obtention du ligand L^{31}) puisqu'ils diffèrent de ceux

de la chaîne diaminée de départ. Des essais de cristallisation du filtrat sont en cours afin de pouvoir isoler l'espèce majoritaire présente et ainsi confirmer qu'il s'agit bien du ligand L³¹.

Si le ligand L³¹ peut être obtenu pur, il sera alors possible d'envisager la formation d'une espèce tricyclique via un processus de N-alkylation, après déprotection du groupement protecteur Boc (Schéma 5. 10).

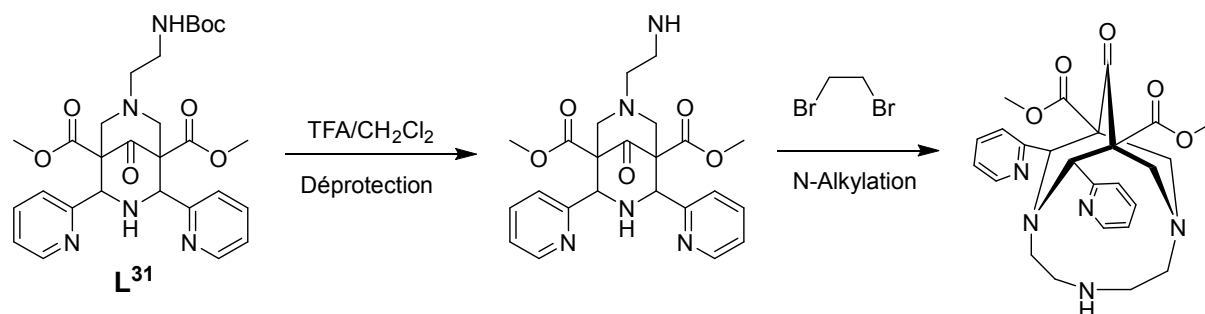


Schéma 5. 10: Voie de synthèse proposée pour l'obtention du composé tricyclique obtenu par N-alkylation.

3. Conclusion

En conclusion de cette partie, nous avons tenté d'agrandir la famille des bispidones, d'une part, en vue d'une complexation d'autres éléments, les lanthanides et d'autre part, en vue d'augmenter la sélectivité pour le cuivre(II) à l'intérieur de la poche bispidine.

Les précurseurs et ligand obtenus pour la complexation des lanthanides ne sont pas encore adaptés au vu des contraintes de réactivité et de stéréochimie. Des étapes d'optimisation restent à réaliser afin de pouvoir proposer un nombre de coordination suffisant pour une complexation forte.

La voie des cages tricycliques semble prometteuse, du fait de l'obtention de deux nouveaux ligands (une bispidine tricyclique et une bis-bispidone). En effet, l'insertion d'une chaîne de longueur variable pourrait apporter une sélectivité plus importante du ligand pour certains métaux. L'obtention de la bis-bispidone nous permettrait d'étendre la complexation à de gros éléments.

Ces différents essais ont démontré la difficulté d'obtenir de nouvelles entités bispidines ce qui peut expliquer la « faible » diversité de bispidones décrites dans la littérature (chap. I).

- ¹ Jorgensen, C. K. *Inorg. Chim. Acta.* **1987**, *139*, 1.
- ² Binnemans, K. Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283–4374.
- ³ Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium (III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293–2352.
- ⁴ Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry. *Oxford University Press*, **2010**.
- ⁵ Wang, Q.; Nchimi Nono, K.; Syrjänpää, M.; Charbonnière, L. J.; Hovinen, J.; Härmä, H. Stable and Highly Fluorescent Europium(III) Chelates for Time-Resolved Immunoassays. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 8461–8466.
- ⁶ Nchimi-Nono, K.; Wegner, K. D.; Lindén, S.; Lecointre, A.; Ehret-Sabatier, L.; Shakir, S.; Hildebrandt, N.; Charbonnière, L. J. Activated Phosphonated Trifunctional Chelates for Highly Sensitive Lanthanide-Based FRET Immunoassays Applied to Total Prostate Specific Antigen Detection. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6493.
- ⁷ Zhang, J.; Badger, P. D.; Geib, S. J.; Petoud, S. Sensitization of Near-Infrared-Emitting Lanthanide Cations in Solution by Tropolonate Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2508–2512.
- ⁸ Petoud, S.; Cohen, S. M.; Bünzli, J.-C. G.; Raymond, K. N. Stable Lanthanide Luminescence Agents Highly Emissive in Aqueous Solution: Multidentate 2-Hydroxyisophthalamide Complexes of Sm³⁺, Eu³⁺, Tb³⁺, Dy³⁺. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13324–13325.
- ⁹ Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
- ¹⁰ Nonat, A.; Imbert, D.; Pécaut, J.; Giraud, M.; Mazzanti, M. Structural and Photophysical Studies of Highly Stable Lanthanide Complexes of Tripodal 8-Hydroxyquinolinate Ligands Based on 1,4,7-Triazacyclononane. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 4207–4218.
- ¹¹ Tallec, G.; Imbert, D.; Fries, P. H.; Mazzanti, M. Highly Stable and Soluble Bis-Aqua Gd, Nd, Yb Complexes as Potential Bimodal MRI/NIR Imaging Agents. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 9490–9492.
- ¹² Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. Substitution-Assisted Stereochemical Control of Bispidone-Based Ligands. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 11167–11176.
- ¹³ Vicentini, G.; Zinner, L. B.; Zukerman-Schpector, J.; Zinner, K. Luminescence and Structure of Europium Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *196*, 353–382.
- ¹⁴ Comby, S.; Imbert, D.; Chauvin, A.-S.; Bünzli, J.-C. G. Stable 8-Hydroxyquinolinate-Based Podates as Efficient Sensitizers of Lanthanide Near-Infrared Luminescence. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 732–743.
- ¹⁵ Regueiro-Figueroa, M.; Bensenane, B.; Ruscsák, E.; Esteban-Gómez, D.; Charbonnière, L. J.; Tircsó, G.; Tóth, I.; Blas, A. de; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C. Lanthanide DOTA-like Complexes Containing a Picolinate Pendant: Structural Entry for the Design of LnIII-Based Luminescent Probes. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 4125–4141.

¹⁶ Jew, S.; Park, B.; Lim, D.; Kim, M. G.; Chung, I. K.; Kim, J. H.; Hong, C. I.; Kim, J.-K.; Park, H.-J.; Lee, J.-H.; et al. Synthesis of 6-Formyl-Pyridine-2-Carboxylate Derivatives and Their Telomerase Inhibitory Activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 609–612.

¹⁷ McCarthy, D. W.; Shefer, R. E.; Klinkowstein, R. E.; Bass, L. A.; Margeneau, W. H.; Cutler, C. S.; Anderson, C. J.; Welch, M. J. Efficient Production of High Specific Activity ⁶⁴Cu Using a Biomedical Cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 35–43.

¹⁸ Kuhl, U.; Englberger, W.; Haurand, M.; Holzgrabe, U. Diazabicyclo [3.3. 1] Nonanone-Type Ligands for the Opioid Receptors. *Arch. Pharm.* **2000**, *333*, 226–230.

¹⁹ Samhammer, A.; Holzgrabe, U.; Haller, R. Synthese, Stereochemie Und Analgetische Wirkung von 3, 7-Diazabicyclo [3.3. 1] Nonan-9-Onen Und 1, 3-Diazaadamantan-6-onen1). *Arch. Pharm.* **1989**, *322*, 551–555.

Chapitre VI : Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a porté sur l'élaboration d'une nouvelle famille de chélatants en vue d'applications en Tomographie par Emission de Positrons. Au vu des ligands décrits dans la littérature, notre choix s'est porté sur la conception d'une nouvelle famille de bispidines. En effet, ces molécules présentent l'intérêt de posséder une structure rigide et pré-organisée permettant l'accueil de métaux de transition et notamment du cuivre(II), dont la complexation a été largement étudiée. De plus, le cuivre 64 est actuellement un radioélément dont l'utilisation est en plein essor dans le cadre de la TEP car il possède des caractéristiques plus intéressantes que le fluor 18 pour le marquage d'anticorps et comme agent théranostic (couple $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$).

Nous avons donc synthétisé une première famille de ligands comportant divers substituants afin d'étudier l'influence de la variation de la sphère de coordination sur l'affinité du ligand pour le métal. Tous les ligands prévus n'ont cependant pas pu être obtenus du fait de certaines contraintes de réactivité et de stéréochimie. Ce point est un des facteurs limitant de l'expansion de la famille des bispidines.

Nous nous sommes concentrés sur trois dérivés L^1 , L^4 et L^7 comportant respectivement les motifs ester éthylique, acide carboxylique et thiophène. Des étapes d'optimisation ont dû être apportées sur ces ligands afin d'obtenir des ligands stables et solubles en milieu aqueux, L^3 , L^6 et L^9 . Pour cela, une étape de réduction a d'abord été mise au point afin de remplacer la fonction cétone centrale par une fonction alcool et ainsi de s'affranchir de la dégradation du ligand par la réaction de rétro-Mannich. Puis les fonctions esters présentes sur les ligands ont été saponifiées afin que la présence des acides carboxyliques permette une bonne solubilisation des composés lors des études physico-chimiques mais également en perspectives d'essais *in vitro* et *in vivo*.

Tous ces ligands ont été obtenus dans une conformation chaise-chaise pour le bicycle et avec les motifs pyridines en configuration *cis*. Ces paramètres sont cruciaux afin d'avoir une cavité adaptée à la complexation optimale du métal.

Les études structurales, physico-chimiques et électrochimiques décrites dans la troisième partie ont démontré que le ligand L^3 nouvellement obtenu présentait toutes les caractéristiques nécessaires pour l'obtention d'un bon chélatant du cuivre 64. Ce ligand complexe sélectivement le cuivre(II) (par rapport au zinc(II), cobalt(II) et nickel(II)) avec une cinétique de complexation rapide et une constante d'affinité élevée ($\log \beta_{\text{CuL}3} = 19,2$). Une fois le complexe formé, celui-ci reste stable en milieu réducteur ($E_{1/2} = -0,43 \text{ V (ENH)}$) et montre une bonne inertie (stable

en milieu acide). C'est donc un très bon candidat au niveau thermodynamique et cinétique pour la complexation du cuivre 64.

Le ligand L⁹ semblait prometteur au niveau de son affinité pour le cuivre ($\log\beta_{\text{CuL}9} = 19,4$) mais sa cinétique de complexation s'est révélée très lente. Ce dernier point est rédhibitoire dans le cadre d'application en TEP puisque le facteur temps est essentiel.

Le ligand L⁶, qui possède une sphère de complexation identique au ligand L³, a montré des caractéristiques électrochimiques similaires, ce qui laisse présager des caractéristiques cinétiques et thermodynamiques identiques à celui-ci.

Cette sphère de complexation avec deux azotes tertiaires, deux azotes pyridiniques et un acide carboxylique semble donc être un bon choix pour le développement de chélatants bifonctionnels basés sur des squelettes bispidines.

La quatrième partie a donc porté sur l'insertion d'une fonction de couplage permettant la fonctionnalisation de la molécule. Notre choix s'est porté sur l'insertion d'un acide aminé bifonctionnel, la lysine. La synthèse a été effectuée telle que décrite dans la deuxième partie de ce manuscrit et nous a permis d'obtenir le premier chélatant bifonctionnel, le ligand L¹³. Ce ligand a montré une bonne complexation du cuivre(II) par spectroscopie UV-visible ; la présence de la chaîne latérale de la lysine ne semble donc pas gêner l'affinité du ligand pour le métal.

Ce ligand L¹³ a ensuite été couplé à divers motifs. Le premier d'entre eux, le ligand L¹⁴, est une sonde bimodale (UV-visible et TEP). En effet, le ligand L¹³ a pu être couplé avec un motif Bodipy, présentant des caractéristiques intéressantes pour une détection par émission de fluorescence dans le visible ($\lambda_{\text{ex}} = 522 \text{ nm}$). Les différentes études ont montré un phénomène de transfert d'électron photo-induit, déjà démontré dans la littérature pour d'autres composés en présence de cuivre(II). La diminution de la fluorescence a donc pu être suivie pour l'étude de la complexation du ligand L¹⁴ avec le cuivre(II). Une bonne affinité de celui-ci pour le métal a été observée ; la taille du motif Bodipy n'induit donc pas d'encombrement stérique gênant la complexation.

Le ligand L¹⁵ a ensuite été synthétisé afin d'obtenir un motif biologique ciblant sur le CBF. Une première approche a été l'introduction de la biotine sur la chaîne latérale de la lysine en vue d'essais de couplage sur des anticorps streptavidinés.

Une autre approche est d'introduire une fonction maléimide, permettant par la suite des couplages quantitatifs dans des conditions douces, sans purification. Le ligand L¹⁶ a ainsi été obtenu après réaction avec un motif NHS-maléimide. L'obtention de cette fonction sur notre CBF nous a permis de tester sa réactivité sur un peptide comportant un acide aminé cystéine, pour lequel cette fonction réagit régiosélectivement. Une confirmation de ce couplage sur la cystéine a pu être obtenue grâce à un suivi par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Il sera donc possible d'utiliser ce CBF L¹⁶ pour cibler des peptides d'intérêt contenant une ou plusieurs cystéines.

En parallèle de cette voie de fonctionnalisation par la lysine, une deuxième voie a été développée en alkylant l'alcool central par une réaction de Williamson. Une chaîne bromée possédant également une fonction amine protégée a pu être introduite sur le carbone C9. Après déprotection du groupement protecteur Boc, les esters ont été saponifiés afin d'obtenir un nouveau chélatant bifonctionnel dont la purification est encore en cours. Cette voie va permettre d'introduire des motifs biologiques ou des espaceurs sur le dessus du bicycle, ceci présentant alors l'avantage d'un encombrement quasi-inexistant au niveau de la sphère de coordination pour le cuivre(II) mais également la possibilité d'introduire de nouveaux substituants en position R₂ afin d'améliorer, si besoin, la sélectivité et la stabilité.

Deux voies de fonctionnalisation ont donc été développées avec succès, permettant d'obtenir plusieurs chélatants bifonctionnels dont certains peuvent d'ores et déjà être utilisés pour des essais de radiomarquage et des tests sur des modèles animaux.

Enfin, la cinquième partie de ce travail porte sur l'extension de notre famille de bispidines pour la complexation d'autres éléments (les lanthanides) mais également pour l'obtention de cages tricycliques permettant de moduler la taille de la cavité pour l'accueil du métal et ainsi de faire varier la sélectivité de la molécule.

Deux ligands ont été pensés pour la complexation des lanthanides, L¹⁸ et L²⁹. Pour cela, deux nouveaux précurseurs ont été synthétisés, P₄ et P₅. Cette synthèse nous a permis de confirmer l'importance de la configuration obtenue. En effet, le ligand L¹⁸ n'a été obtenu qu'en configuration *trans*, dû à l'utilisation du précurseur P₅, majoritairement sous forme *trans*. Le ligand L²⁹, quant à lui, n'a pu être obtenu malgré l'obtention du précurseur P₄ exclusivement en configuration *cis* dû à un problème de réactivité. Des optimisations restent donc à être apportées sur ce point afin d'obtenir de bons chélatants des ions lanthanides.

D'autre part, nous nous sommes intéressés à l'obtention de cages tricycliques qui permettraient la formation de complexes plus stables et plus sélectifs. De tels ligands devaient être obtenus à partir d'une bispidone possédant deux fonctions NH en positions R_1 et R_2 , par une double réaction d'alkylation à partir d'une chaîne dibromée d'une longueur intéressante. Le composé bis-NH n'a pu être isolé et c'est le ligand tricyclique L^{17} qui a été obtenu. Celui-ci possède donc une cage mais la configuration des pyridines en *trans* ainsi que la taille du cycle ne semble pas en faire un bon candidat pour une application en complexation.

Le deuxième ligand obtenu, L^{19} , se trouve être un ligand bis-bispidone. Celui-ci pourra être utilisé pour la complexation d'éléments plus gros que le cuivre(II), par exemple en reliant les deux positions R_1 par une réaction d'alkylation.

En conclusion, ce travail nous a donc permis d'obtenir une sphère de coordination adaptée à la complexation du cuivre(II) et possédant de bonnes caractéristiques pour des applications en TEP. Des chélatants bifonctionnels ont pu être obtenus grâce à différentes voies de fonctionnalisation. Ce travail nous a également permis de constater la réelle difficulté de concevoir de nouvelles bispidines pour la complexation, car les nombreuses géométries potentiellement adoptées par celles-ci réduisent le nombre des possibilités intéressantes.

Chapitre VII : Partie expérimentale

General Methods. Solvents and starting materials were purchased from Aldrich, Acros and Alfa Aesar and used without further purification. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum One Spectrophotometer as solid samples and only the most significant absorption bands are given in cm^{-1} . Elemental analyses and mass spectrometry analysis were carried out by the Service Commun d'Analyses of the University of Strasbourg. Purifications were made on a Spot II Interchim Flash Purification Liquid Chromatography. Distilled water was purified by passing through a mixed bed of ion-exchanger (Bioblock Scientific R3-83002, M3-83006) and activated carbon (Bioblock Scientific ORC-83005). All the stock solutions were prepared by weighing solid products using an AG 245 Mettler Toledo analytical balance (precision 0.01 mg). Metal cation solutions were prepared from their perchlorate salts ($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%, Fluka; $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98.9%, Alfa Aesar; $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2$ 98%, Fluka and $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%, Aldrich) and their concentrations were determined by colorimetric titrations with EDTA (10^{-2} M, Merck, Titriplex III) according to standard procedures.¹ Sodium Hydroxyde (NaOH) and perchloric acid (HClO_4) were used to adjust pH during titrations. The ionic strength of all the solutions was fixed to 0.1 M with potassium chloride (KCl, Fluka, 99.0%). All the experiments described were repeated at least three times.

*CAUTION! Perchlorate salts combined with organic ligands are potentially explosive and should be handled in small quantities and with the adequate precautions.*²

X-ray Crystallography. Suitable crystals for X-ray diffraction were obtained for L^1 , $[\text{Zn}(\text{L}^1(\text{COOH})\text{Cl})]$ and L^{17} . The crystals were placed in oil, and a single crystal was selected, mounted on a glass fiber and placed in a low-temperature N_2 stream. X-Ray diffraction data collection for $[\text{Zn}(\text{L}^1(\text{COOH})\text{Cl})]$ and L^{17} were carried out on a Bruker APEX II DUO Kappa-CCD diffractometer equipped with an Oxford Cryosystem liquid N_2 device, using $\text{Mo-K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The crystal-detector distance was 38 mm. The cell parameters were determined (APEX2 software)³ from reflections taken from three sets of 12 frames, each at 10 s exposure. Diffraction data for L^1 was recorded on a Nonius Kappa-CCD diffractometer equipped with an Oxford Cryosystem liquid N_2 device, using $\text{Mo-K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The crystal-detector distance was 36 mm. The cell parameters were determined from reflections taken from one set of 10 frames (1.0° steps in phi angle), each at 20 s exposure (Denzo software).⁴ The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97.⁵ The refinement and all further calculations were carried out using SHELXL-97.⁶ The H-atoms were included in calculated positions and treated as riding atoms using SHELXL default parameters. The non-H atoms were refined anisotropically, using weighted full-matrix least-

squares on F2. A semi-empirical absorption correction was applied using SADABS in APEX2⁷ transmission factors: $T_{\min}/T_{\max} = 0.6981/0.7695$. The SQUEEZE instruction in PLATON was applied.⁸ The residual electron density was assigned to two molecules of water solvent.

Solution NMR studies. ¹³C NMR spectra and 2D COSY, NOESY and HSQC experiments were recorded on Avance 300 and Avance 400 spectrometers operating at 300 and 400 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in ppm, with residual protonated solvent as internal reference.⁹ The multiplicity of signals are given for the ¹H NMR spectra (s: singlet, d: doublet, dd: doublet of doublet, t: triplet, q: quadruplet and m: multiplet).

Potentiometry. The protonated species of **L**³ and **L**⁹ and the stability constants of **L**³ complexes with Cu(II), Zn(II), Co(II) and Ni(II) complexes were characterized and quantified by potentiometric titrations in water. All the solutions used in the potentiometric experiments were prepared from boiled and degassed water. Titrations were performed using an automatic titrator system (DMS 716 Titrino, Metrohm) with a combined glass electrode (Metrohm, 6.0234.100, Long Life) filled with NaCl 0.1 M. The electrode was calibrated as a hydrogen concentration probe by titrating known amounts of perchloric acid with CO₃²⁻ free sodium hydroxide solutions. The GLEE program¹⁰ was used for the glass electrode calibration.

In a typical experiment, an aliquot of 10 mL of **L** (10⁻³ M) or M:**L** (M = Zn(II), Co(II) or Ni(II), [M]/[L] ≈ 1) was introduced into a thermostated jacketed cell (25.0(2) °C, Metrohm) and kept under argon during the titrations. The titrations were then carried out by addition of known volumes of sodium hydroxide solution over the pH range 2-12. The potentiometric data of **L** and its metal complexes were refined with the Hyperquad 2008 program¹¹ which uses non-linear least-squares methods, taking into account the formation of metal hydroxide species. The titration of each system was repeated at least in triplicate and the sets of data for each system were treated independently, then merged together and treated simultaneously to give the final stability constants. The distribution curves as a function of pH of the protonated species of **L**³ and **L**⁹ and of **L**³ and **L**⁹ metal complexes were calculated using the Hyss2009 program.¹²

Spectrophotometry. The protonation constants of **L**³ and **L**⁹ and the stability constants of M:**L** (M = Cu(II), Zn(II), Co(II) and Ni(II) for **L**³ and M = Cu(II) for **L**⁹, [M]/[L] = 1, [L] ~ 10⁻⁴ M) were also determined by UV-Visible spectrophotometric titration versus pH by recording simultaneously pH and UV-visible spectra. Since complexation started in very acidic medium, the titrations were carried out in two different ways. Between pH 0 and 2, batch solutions were

prepared. Each sample was prepared separately by mixing a known amount of **L** stock solution, a known amount of standardized HClO₄ to adjust the pH ($\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$) and a known amount of Cu(II) stock solution in the case of the study of the complexes ($[\text{Cu(II)}]/[\text{L}] = 1$). Between pH 2 and 12.5, direct titrations were carried out. Typically, an aliquot of 10 mL of **L** solution was introduced into a thermostated jacketed cell (25.0(2) °C) with 1 equivalent of metal (M) in the case of M:L titrations. A known volume of perchloric acid solution was added to adjust the pH at 2 and the titrations were carried out by addition of known volumes of potassium hydroxide solution. The free hydrogen ion concentrations were measured with a Mettler Toledo U402-S7/120 (pH 0-14) combined glass electrode. Potential differences were given by a Tacussel LPH430T millivoltmeter. Standardization of the millivoltmeter and verification of the linearity of the electrode were performed with three commercial buffer solutions (pH 4.01, 7.01 and 10.01, 25°C).

For all the spectrophotometric titrations absorption spectra versus pH were recorded in 1 cm quartz suprasil cells using a Varian (Cary 3) spectrophotometer equipped with a thermoregulated cell compartment (25.0(2)°C). The software SPECFIT Global Analysis System V3.0 32 bit for Windows was used to determine the coordination model and calculate the stability constants ($\log \beta$) of the formed species.¹³

Acid decomplexation studies. Acid-decomplexation studies were performed under pseudo first-order conditions on 1.92×10^{-4} mmol of Cu(II)L³ complex and 1.99×10^{-4} mmol of Cu(II)L⁹ complex in 5 M HCl at 25°C. Changes in the absorption spectra with time were monitored using a Perkin-Elmer Lambda 950 spectrophotometer. The decomplexation reaction was monitored by following the absorbance at 250 and 263 nm over time during 4 months.

Cyclic voltammetry. Cyclic voltammetry (CV) was carried out on the CuL³ and CuL⁶ complex at room temperature with a Radiometer Analytical MDE150/PST50 interfaced to a PC. The CV experiments were performed using a glassy carbon working electrode (0.071 cm², BASi). The electrode surface was polished routinely with 0.05 μm alumina–water slurry on a felt surface immediately before use. The counter electrode was a Pt coil, and the reference electrode was a Ag/AgCl electrode. The CuL complex was measured in Ar-degassed water with ionic strength fixed at 0.1M with KCl, at five different values of pH (pH = 2.38, 4.30, 7.34, 9.36, 11.49) and different scan rates (50-300 mV/s).

Spectrofluorimetry

Steady-state emission and excitation spectra were recorded on a Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3 spectrometer working with a continuous 450 W Xe lamp. Detection was performed with a Hamamatsu R928 photomultiplier. All spectra were corrected for the instrumental functions.

Lifetime

A substance can be excited by a luminous irradiation and photons absorption resulting in a pathway between fundamental state and excited state. When irradiation stops, population of excited states comes back to fundamental state. This deexcitation can result in a light emission. The emission intensity ($I_{em}(t)$) decreases in an exponential way function of time (Equation 7. 1) for mono-exponential decay.

$$I_{em}(t) = I_0 e\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad \text{where } I_0 = \text{intensity of emission at } t = 0, t = \text{time}, \tau = \text{lifetime}$$

Equation 7. 1: Fitting of the time decay emission profiles has a monoexponential decay

Phosphorescence lifetimes were measured on the same instrument working in the phosphorescence mode, with a 50 μ s delay time and a 200 ms integration window. Monoexponential emission decay profiles were fitted with the FAST program from Edinburgh Instruments or with the Data-station software from Jobin Yvon.

Quantum Yield

The efficiency of a luminescent process is characterized by the quantum yield (Φ) which is equal to the ratio of the number of emitting photons *versus* the number of absorbed photons (Equation 7. 2).

$$\Phi = \frac{\text{number of emitting photons}}{\text{number of absorbed photons}}$$

Equation 7. 2: Definition of the quantum yield of luminescence.

The luminescence quantum yield was determined using a Quanta- Φ integrating sphere from Horiba according to the procedure described in literature.¹⁴ The luminescence quantum yield Φ is given by (Equation 7. 3):

$$\Phi = \frac{E_i(\lambda) - (1-A)E_0(\lambda)}{L_e(\lambda)A} \quad (1) \quad \text{where} \quad A = \frac{L_0(\lambda) - L_i(\lambda)}{L_0(\lambda)} \quad (2)$$

Equation 7. 3: Equation for the calculation of the luminescence quantum yield.

in which $E_i(\lambda)$ is the integrated luminescence of the sample caused by direct excitation, $E_0(\lambda)$ is the integrated luminescence of the sample caused by illumination from the sphere, A is the

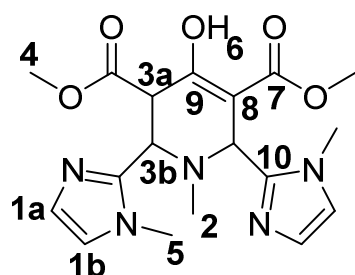
absorbance of the sample, $L_e(l)$ is the integrated excitation profile from the empty integration sphere (without the sample), $L_0(l)$ is the integrated excitation profile when the sample is diffusively illuminated by the integration sphere and $L_i(l)$ is the integrated excitation profile upon direct excitation of the sample by the incident beam. The integrated spectra were corrected for the wavelength sensitivity of the photomultiplier and the spectral response of the sphere using correction functions furnished by the supplier.

Titration

A solution of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ ($[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2] = 5.05 \times 10^{-4} \text{ M}$, $\text{HCl} 1 \times 10^{-3} \text{ M}$) was added in aliquots to a solution of ligand L^{14} ($[\text{L}^{14}] = 4.63 \times 10^{-5} \text{ M}$) in Tris HCl buffer 0.1 M (pH 6.5). Fluorescence emission spectra were recorded upon excitation at $\lambda_{\text{ex}} = 522 \text{ nm}$ (slits 2:1).

Synthesis of the precursors.

Precursor P_2



Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5$

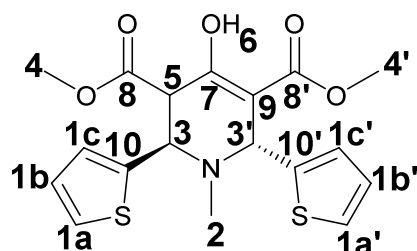
Molecular weight: 389.41 g/mol

To a methanol solution (16 mL) containing methyl-3-oxo-1,5-pentanedioate (754 μL , 5.22 mmol) was added N-methyl-2-imidazolecarboxaldehyde (1.153 g, 10.4 mmol) at 0°C . After 15 minutes under stirring, methylamine (452 μL , 5.22 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred 5h30 at 0°C . Then, the slow evaporation of methanol gave a yellow precipitate which was filtered and washed with a little amount of cold MeOH. The obtained product was recrystallized in methanol (50 mL) at 57°C and a white powder (containing a mixture of cis-ketone (36%) and cis-enol (64%) isomers) was formed, filtered and washed (1.15 g, 56%).

Rf = 0.6 (SiO_2 ; DCM/MeOH, 90/10). **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, CDCl_3): **cis-enol (66%)**: 12.42 (s, 1H, 6), 6.97 (m, 1H, 1b'), 6.88 (dd, 2H, 1a+1a'), 6.73 (d, 1H, 1b), 4.58 (AB system, $\delta_A = 4.76$, $\delta_B = 4.40$, $J_{AB} = 11.4 \text{ Hz}$, $\nu_A = 1906 \text{ Hz}$, $\nu_B = 1761 \text{ Hz}$, 2H, 3b enol), 4.66 (s, 1H, 3a enol), 3.73 (s, 3H, 4), 3.68 (s, 3H, 4), 3.67 (s, 3H, 5), 3.07 (s, 3H, 5), 2.24 (s, 3H, 2); **cis-ketone (34%)**: $\delta = 6.92$ (d, 2H, 1a), 6.86 (d, 2H, 1b), 4.69 (AB system, $\delta_A = 4.84$, $\delta_B = 4.48$, $J_{AB} = 11.4 \text{ Hz}$, $\nu_A = 1968 \text{ Hz}$, $\nu_B = 1792 \text{ Hz}$, 4H, 3a/3b ketone) 3.71 (s, 6H, 4), 3.45 (s, 6H, 5), 1.80 (s, 3H, 2). **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 199.4$ (9, ketone), 171.5 (7/8), 169.8 (7/8), 168.8 (7/8), 167.3 (7/8), 147.3 (10, ketone), 144.2 (10, enol), 143.7 (10, enol), 127.6 (1a, 1b), 127.4 (1a, 1b), 127.2

(1a, 1b), 122.1 (1a, 1b), 121.6 (1a, 1b), 121.3 (1a, 1b), 95.3 (9, enol), 59.6 (4/3/5), 55.6 (4/3/5), 53.6 (4/3/5), 52.6 (4/3/5), 52.4 (4/3/5), 50.7 (4/3/5), 50.7 (4/3/5), 41.6 (4/3/5), 36.0 (4/3/5), 32.6 (4/3/5), 32.5 (4/3/5), 31.5 (2), 30.1 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): $m/z = 412.17$ ($[M+Na]^+$, 100%), 413.16 ($[M+Na]^+$, 21.5%), 414.16 ($[M+Na]^+$, 1.9%). **Elemental analysis** calculated for $C_{18}H_{23}O_5N_5 \cdot CH_3OH$: C, 54.06, H, 6.45, N, 16.59. Found: C, 54.06, H, 6.46, N, 16.67.

Precursor P₃

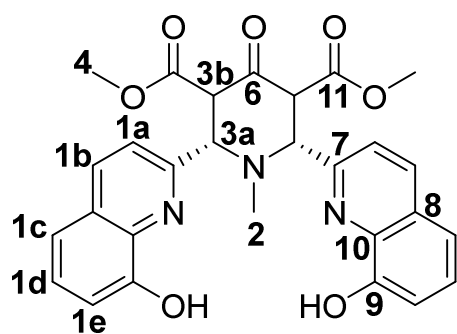


Formula: $C_{18}H_{19}NO_5S_2$

Molecular weight: 393.47 g/mol

To a methanol solution (16 mL) containing methyl-3-oxo-1,5-pentanedioate (1.88 mL, 13.02 mmol) was added 2-thiophene carboxaldehyde (2.43 mL, 25.86 mmol) at 0°C. After 15 minutes under stirring, methylamine (1.13 μ L, 13.05 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred 5h30 at 0°C. Then, the slowly evaporation of methanol gave a white precipitate which was filtered and washed with a little amount of cold MeOH. The pure product (exclusively trans-enol form) was obtained by slow evaporation of the filtrate as a red powder, separated by filtration, washed with cold MeOH and dried under vacuum (156 mg, 3%).

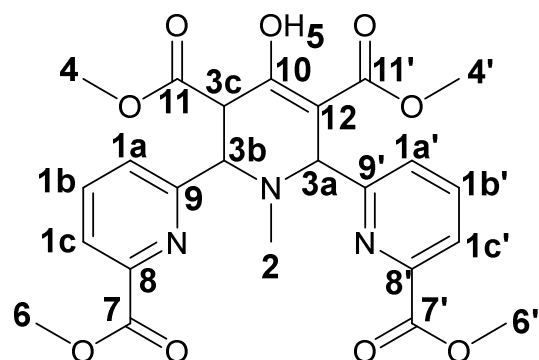
R_f = 0.6 (SiO₂; DCM/MeOH, 90/10) **¹H-NMR** (300 MHz, D₂O): δ = 12.34 (s, 1H, 6), 7.27 (m, 2H, 1a/1a'), 6.93 (m, 4H, 1b/1b'/1c/1c'), 4.83 (s, 1H, 3'), 4.26 (AB system, $\delta_A = 4.70$, $\delta_B = 3.81$, $J_{AB} = 9$ Hz, $\nu_A = 1411$ Hz, $\nu_B = 1143$ Hz, 2H, 3/5), 3.74 (s, 6H, 4/4'), 2.20 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, D₂O): δ = 171.6 (8/8'), 170.2 (8/8'), 166.0 (7), 145.8 (10/10'), 142.1 (10/10'), 126.7 (1a/1a'/1b/1b'/1c/1c'), 126.3 (1a/1a'/1b/1b'/1c/1c'), 126.2 (1a/1a'/1b/1b'/1c/1c'), 126.0 (1a/1a'/1b/1b'/1c/1c'), 125.9 (1a/1a'/1b/1b'/1c/1c'), 125.2 (1a/1a'/1b/1b'/1c/1c'), 100.6 (9), 58.1 (4/4'), 57.1 (4/4'), 52.8 (3/3'/5), 51.9 (3/3'/5), 49.2 (3/3'/5), 37.2 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): $m/z = 416.06$ ($[M+Na]^+$, 100%), 417.06 ($[M+Na]^+$, 19.5%), 418.05 ($[M+Na]^+$, 9%).

Precursor P₄**Formula:** C₂₈H₂₅O₇N₃**Molecular weight:** 515.51 g/mol

8-hydroxyquinoline-2-carbaldehyde (672 mg, 3.88 mmol) and methylamine (168 μ L, 1.94 mmol) were solubilized in methanol (14 mL) at 0°C. After 5 minutes, methyl-3-oxo-1,5-pentanedioate (280 μ L, 1.94 mmol)

was added and the solution was stirred during 3h in an ice bath. After some days at 4°C, the obtained crystals were filtered and washed with a minimum amount of cold methanol. The solid was recrystallized in warm methanol (31 mL) and filtered hot, to obtain the pure product exclusively in the cis-ketone configuration (407 mg, 14%).

R_f = 0.69 (SiO₂; DCM/MeOH 90:10) **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.25 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 1a), 7.89 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 1e), 7.49 (t, J_1 = 8.3 Hz, J_2 = 7.6 Hz, 2H, 1d), 7.36 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 1b), 7.20 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1c), 4.91 (AB system, δ_A = 5.35, δ_B = 4.47, J_{AB} = 11.2 Hz, ν_A = 2136 Hz, ν_B = 1787 Hz, 4H, 3a/3b), 3.80 (s, 6H, 4), 1.82 (s, 3H, 2), 1.61 (OH). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 201.0 (6), 170.4 (5), 155.4 (9/10), 152.6 (9/10), 137.6 (1a), 136.8 (7), 128.6 (1d), 128.1 (8), 121.8 (1b), 117.8 (1c), 111.2 (1e), 69.1 (3b), 54.4 (3a), 52.7 (4), 30.1 (2). **IR** (cm⁻¹, ATR) ν 3433, 3388, 3361 (w, O-H phenol), 1722 (s, C=O ester), 1650 (m, C=O ketone), 1435, 1472, 1504 (m, C=C aromatic). **Mass ESI/MS** (positive mode): m/z = 516.18 ([M+H]⁺, 100%), 517.19 ([M+H]⁺, 31.7%), 518.19 ([M+H]⁺, 4.6%).

Precursor P₅**Formula:** C₂₄H₂₅O₉N₃**Molecular weight:** 499.47 g/mol

Methyl 6-formylpyridine-2-carboxylate (717 mg, 4.00 mmol) and methylamine (173 μ L, 2.00 mmol) were solubilized in methanol (10 mL) at 0°C. After 5 minutes, methyl-3-oxo-1,5-pentadioate (289 μ L,

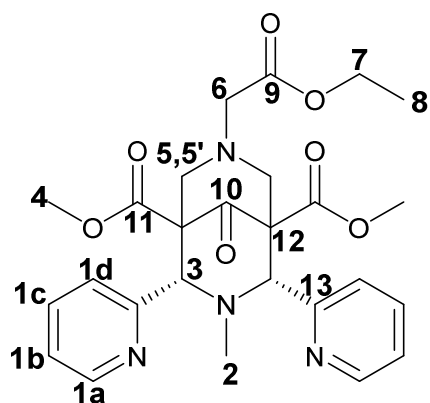
2.00 mmol) was added and the solution was stirred during 5h in an ice bath. After few days at 4°C, white crystals were obtained, which were filtered and washed with a minimum amount of cold methanol. Then recrystallization in warm methanol (20 mL) gave a white precipitate which

was filtered to obtain the crude product as a mixture of two isomers: trans-enol (88%) and cis/trans-ketone (12%) (644 mg, 64%).

Rf = 0.8 (SiO₂; DCM/MeOH 90:10) **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ= 12.52 (s, 1H, 5), 8.01 (d, *J*= 7.8 Hz, 1H, 1c/1c'), 7.95 (d, *J*= 7.8 Hz, 1H, 1c/1c'), 7.82 (t, *J*= 7.9 Hz, 1H, 1b/1b'), 7.73 (m, 2H, 1b/1b'+1a/1a'), 7.53 (d, *J*= 7.8 Hz, 1H, 1a/1a'), 4.92 (s, 1H, 3a), 4.38 (AB system, δ_A = 4.61, δ_B = 4.14, *J*_{AB} = 9.2 Hz, ν_A = 1385 Hz, ν_B = 1242 Hz, 2H, 3b/3c), 3.99 (s, 3H, 6/6'/4), 3.95 (s, 3H, 6/6'/4), 3.93 (s, 3H, 6/6'/4), 3.58 (s, 3H, 4'), 2.27 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ= 172.0 (7/7'), 171.6 (7/7'), 167.6 (10), 166.2 (11/11'), 165.7 (11/11'), 161.5 (8/8'), 158.7 (8/8'), 147.9 (9/9'), 147.2 (9/9'), 137.5 (1b/1b'), 137.4 (1b/1b'), 126.4 (1a/1a'), 125.6 (1a/1a'), 124.2 (1c/1c'), 123.9 (1c/1c'), 98.4 (12), 64.8 (3a), 61.0 (3b), 53.0 (4/6/6'), 52.8 (4/6/6'), 52.7 (4/6/6'), 51.9 (4'), 45.1 (3c), 38.0 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 500.17 ([M+H]⁺, 100%), 501.17 ([M+H]⁺, 27.4%), 502.17 ([M+H]⁺, 3.4%).

Synthesis of ligands

Ligand L¹



Formula: C₂₆H₃₀O₇N₄

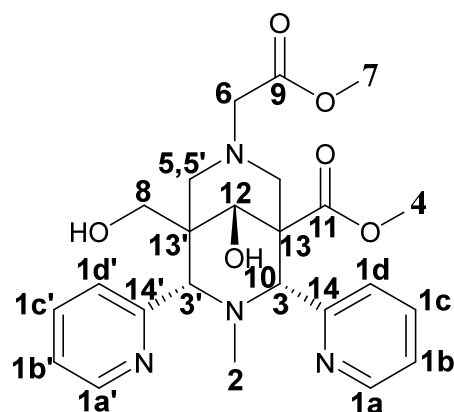
Molecular weight: 510.54 g/mol

Dimethyl-1-methyl-4-oxo-2,6-dipyridin-2-yl-3,5-dicarboxylate (P₁) (1.54 g, 4.00 mmol), ethyl glycinate deprotonated (0.57 g, 4.40 mmol) and formaldehyde (0.90 mL, 12.00 mmol) were dissolved in 15 mL of anhydrous MeOH and stirred at 55°C for 3h. Formation of crystals was observed at room temperature and then the mixture was placed at 4°C to obtain complete crystallization. The crystals were filtered and washed with minimum of cold EtOH. The product was recrystallized in MeOH and placed at 4°C. The obtained solid crystals were filtered once again and washed with cold EtOH to give 550 mg of a white powder (Yield: 60%).

Rf = 0.8 (Al₂O₃; DCM/MeOH, 90/10) **¹H-NMR** (CDCl₃, 300 MHz): δ= 8.55 (m, 2H, 1d), 8.22 (d, *J*= 7.9 Hz, 2H, 1a), 7.84 (td, *J*₁= 7.7 Hz, *J*₂= 1.8 Hz, 2H, 1b), 7.26 (dd, *J*₁= 7.6 Hz, *J*₂= 4.9 Hz, 2H, 1c), 4.80 (s, 2H, 3), 4.19 (q, *J*= 7.2 Hz, 2H, 7), 3.88 (s, 6H, 4), 3.32 (s, 2H, 6), 3.06 (s, 4H, 5,5'), 2.10 (s, 3H, 2), 1.29 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H, 8) **¹³C-NMR** (CDCl₃, 75 MHz): δ= 203.1 (10), 169.8 (9), 168.4 (11), 158.8 (13), 149.2 (1a/1b/1c/1d), 136.5 (1a/1b/1c/1d), 123.7

(1a/1b/1c/1d), 123.0 (1a/1b/1c/1d), 77.2 (6), 73.7 (3), 62.4 (12), 60.6 (5,5'), 57.9 (7), 52.5 (4), 43.4 (2), 14.2 (8). **IR** (cm⁻¹, ATR) ν 1729 (s, C=O ester), 1713 (s, C=O ketone), 1430-1588 (m, C=C aromatic), 1252 (s, C-N aromatic), 1157 (s, C-O ester). **Mass ESI/MS** (positive mode): $m/z = 511.21$ ([M+H]⁺, 100%) **Elemental analysis** calculated for C₂₆H₃₀N₄O₇: C, 61.17; H, 5.92; N, 10.97. Found: C, 61.34; H, 5.98; N, 11.34.

Ligand L²



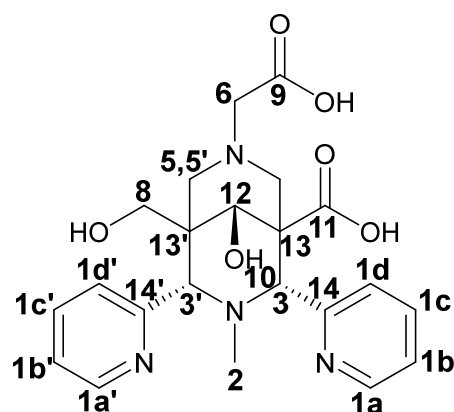
Formula: C₂₄H₃₀O₆N₄

Molecular weight: 470.52 g/mol

To a solution of L¹ (1.62 g, 3.17 mmol) in methanol (200 mL), sodium borohydride (1.198 g, 31.80 mmol) was added at 0°C. After 30 minutes, the mixture was placed at room temperature for 6 days. Then, a solution of saturated NH₄Cl (10 mL) was added and, after 5 minutes, solvent

was removed under reduced pressure. The crude product was solubilized in CH₂Cl₂ by ultrasonic treatment and salts were eliminated by filtration. The filtrate was evaporated and solubilized in a solution of CH₃CN/0.1% TFA during 5 minutes. After evaporation, the mixture was purified by FPLC (SiO₂, DCM/MeOH gradient 95/5 to 80/20) to obtain a pure white powder (402 mg, 23%).

R_f = 0.54 (SiO₂; DCM/MeOH, 80/20) **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.70 (m, 2H, 1a/1a'), 7.86 (m, 2H, 1c/1c'), 7.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 1d), 7.71 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 1d'), 7.37 (m, 2H, 1b/1b'), 6.97 (s broad, 1H, 10), 5.69 (s, 1H, 3/3'), 5.32 (s, 1H, 3/3'), 4.55 (s, 1H, 12), 3.63 (s, 3H, 4/7), 3.62 (s, 3H, 4/7), 3.56 (s, 2H, 6), 3.40 (AB system, $\delta_A = 3.61$, $\delta_B = 3.18$, $J_{AB} = 11.8$ Hz, $\nu_A = 1084$ Hz, $\nu_B = 952$ Hz, 2H, 8), 3.14 (AB system, $\delta_A = 3.37$, $\delta_B = 2.90$, $J_{AB} = 11.8$ Hz, $\nu_A = 1012$ Hz, $\nu_B = 871$ Hz, 2H, 5/5'), 2.78 (AB system, $\delta_A = 2.94$, $\delta_B = 2.61$, $J_{AB} = 11.8$ Hz, $\nu_A = 882$ Hz, $\nu_B = 784$ Hz, 2H, 5/5'), 2.36 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ = 168.0 (9/11), 167.4 (9/11), 149.6 (14/14'), 148.8 (14/14'), 147.4 (1a/1a'), 146.9 (1a/1a'), 135.4 (1c/1c'), 135.3 (1c/1c'), 125.5 (1d/1d'), 123.6 (1d/1d'), 122.0 (1b/1b'), 122.0 (1b/1b'), 69.1 (12), 64.8 (3/3'), 63.9 (3/3'), 60.9 (8), 53.8 (6), 50.8 (5/5'), 50.2 (5/5'), 50.2 (4/7), 50.1 (5/5'), 48.9 (4/7), 41.0 (2), 40.7 (13'). **Mass ESI/MS** (positive mode): $m/z = 471.22$ ([M+H]⁺, 100%), 472.23 ([M+H]⁺, 26.5%), 473.23 ([M+H]⁺, 4.9%). **Elemental analysis** calculated for C₂₄H₃₀O₆N₄.NaCl.CH₃OH: C, 53.52, H, 6.11, N, 9.99. Found: C, 53.88, H, 5.88, N, 10.05.

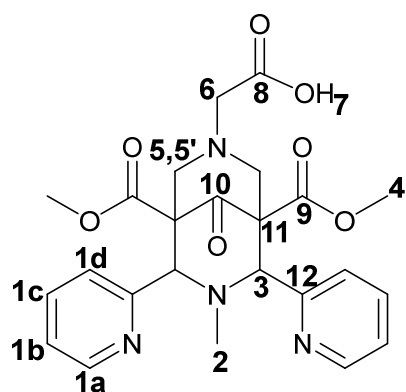
Ligand L³

Formula: C₂₂H₂₆O₆N₄

Molecular weight: 442.47 g/mol

Ligand L² (40 mg, 0.09 mmol) was solubilized in H₂O (3 mL) and NaOH (10.8 mg, 0.27 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature during 5 days and evaporated. The obtained solid was dissolved in a minimum of H₂O and addition of a great amount of THF (4 mL) resulted in the formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give the reduced and hydrolyzed ligand. Then, HCl 1M was added to protonate the ligand and a filtration on a reverse phase column gave the pure product (168 mg, 24%).

Rf = 0.81 (Al₂O₃; DCM/MeOH, 50/50); 0.62 (C₁₈; H₂O/MeOH, 75/25) **¹H-NMR** (300 MHz, D₂O): δ= 8.69 (m, 2H, 1a/1a'), 7.79 (AB system, δ_A = 7.69, δ_B = 7.64, J_{AB}= 7.8 Hz, ν_A = 2306 Hz, ν_B = 2292 Hz, 2H, 1c), 7.34 (m, 4H, 1b/1b'/1d/1d'), 4.35 (s, 1H, 3'), 4.03 (s broad, 2H, 3/12), 3.22 (AB system, δ_A = 3.57, δ_B = 2.87, J_{AB}= 10.9 Hz, ν_A = 1071 Hz, ν_B = 862 Hz, 2H, 6), 2.76 (AB system, δ_A = 2.84, δ_B = 2.68, J_{AB}= 7.9 Hz, ν_A = 852 Hz, ν_B = 806 Hz, 2H, 8), 2.36 (AB system, δ_A ≈ 2.84, δ_B = 1.88, J_{AB}= 12.3 Hz, 2H, 5,5'), 2.23 (AB system, δ_A = 2.65, δ_B = 1.80, J_{AB}= 11.2 Hz, ν_A = 797 Hz, ν_B = 540 Hz, 2H, 5,5'), 1.76 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, D₂O): δ= 180.0 (9), 178.9 (11), 159.0 (14/14'), 158.5 (14/14'), 150.0 (1a/1a'), 149.6 (1a/1a'), 137.2 (1c/1c'), 137.0 (1c/1c'), 125.7 (1b/1b'), 124.9 (1b/1b'), 123.1 (1d/1d'), 123.0 (1d/1d'), 72.3 (12), 68.2 (3), 64.7 (8), 64.2 (6), 56.4 (5/5'), 55.5 (5/5'), 51.3 (13), 42.8 (2), 42.1 (13'). **IR** (cm⁻¹, ATR) ν 3257 (broad, O-H alcohol), 3037, 2699 (broad, O-H carboxylic acid), 1723 (s, C=O acid), 1536, 1464 (m, C=C aromatic). **Mass** ESI/MS (positive mode): *m/z* = 443.20 ([M+H]⁺, 100%), 444.20 ([M+H]⁺, 24.4%), 445.20 ([M+H]⁺, 4.4%). **Elemental analysis** calculated for C₂₂H₂₆O₆N₄·2HCl·4NaCl·4H₂O: C, 32.17, H, 4.42, N, 6.82. Found: C, 32.18, H, 4.07, N, 6.81. The purity was confirmed by potentiometry and ¹H-NMR with DMAP as reference.

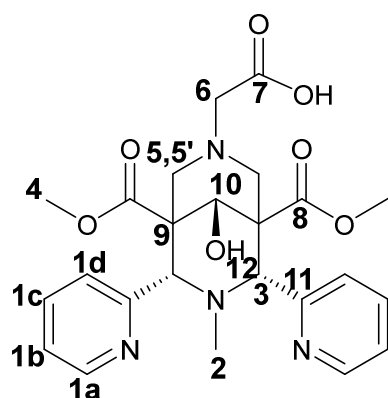
Ligand L⁴

Formula: C₂₄H₂₆O₇N₄

Molecular weight: 482.49 g/mol

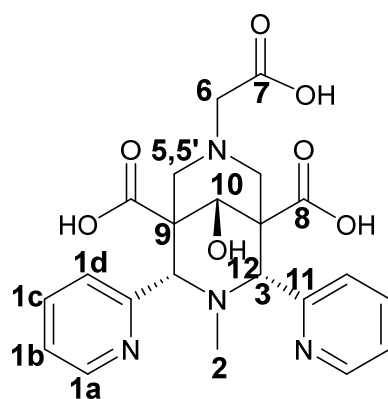
In a solution of methanol (14 mL), glycine (538 mg, 7.17 mmol) and NaHCO₃ (604 mg, 7.17 mmol) were mixed under stirring during 2h at 45°C. Then, formaldehyde (1.46 mL, 19.56 mmol) and precursor P₁ (2.5 g, 6.52 mmol) in methanol (20 mL) were added at room temperature and the mixture was stirred under reflux during 5h. Solvents were removed under reduced pressure and the obtained solid was crystallized in ethanol (26 mL). A precipitate was obtained upon slow evaporation at room temperature. (Crystals can be obtained upon slow evaporation of a mixture of DCM, CHCl₃ and MeOH.) A white powder was obtained after filtration (1.626 g, 52%).

R_f = 0.2 (Al₂O₃; DCM/MeOH, 90/10) **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ= 8.91 (m, 2H, 1a), 7.65 (dd, J₁= 7.8 Hz, J₂= 7.4 Hz, 2H, 1c), 7.22 (d, J= 7.40 Hz, 2H, 1d), 7.20 (dd, J₁= 8.2 Hz, J₂≈ 7.7 Hz, 2H, 1b), 4.66 (s, 3H, 3), 3.72 (s, 6H, 4), 3.13 (AB system, δ_A = 3.53, δ_B = 2.73, J_{AB}= 12.3 Hz, ν_A = 1414 Hz, ν_B = 1093 Hz, 5,5'), 3.02 (s, 2H, 6), 2.14 (broad, 1H, 7), 1.97 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ= 203.0 (10), 174.4 (8), 168.0 (9), 156.2 (12), 151.3 (1a), 137.3 (1d), 124.4 (1b/1c), 124.0 (1b/1c), 72.8 (3), 63.3 (6), 59.1 (5,5'), 52.7 (4), 43.4 (2). **IR** (cm⁻¹, ATR) ν 3369 (broad, O-H acid), 1752 (m, C=O ester), 1732 (s, C=O acid), 1591 (s, C=C aromatic). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 483.19 ([M+H]⁺, 100%), 484.19 ([M+H]⁺, 27.7%), 485.20 ([M+H]⁺, 3.4%). **Elemental analysis** calculated for C₂₄H₂₅O₇N₄Na·2.5H₂O: C, 52.46, H, 5.50, N, 10.20. Found: C, 52.38, H, 5.58, N, 10.37.

Ligand L⁵**Formula:** C₂₄H₂₈O₇N₄**Molecular weight:** 484.50 g/mol

Ligand L⁴ (2.50 g, 5.20 mmol) was dissolved in anhydrous methanol (100 mL) and was cooled at -77°C on a bath of acetone/dry ice. Then, sodium borohydride (0.30 g, 7.80 mmol) was slowly added. After 6h at -77°C, a solution of saturated NH₄Cl (20 mL) was added in the flask and the mixture was stirred during 10 minutes. After evaporation of the solvent, a precipitate was obtained upon addition of DCM. The mixture was filtered and TFA (150 μL) was added in the filtrate. Solvents were removed under reduced pressure and the crude product was obtained as an enantiopure product (2.50 g, 94%).

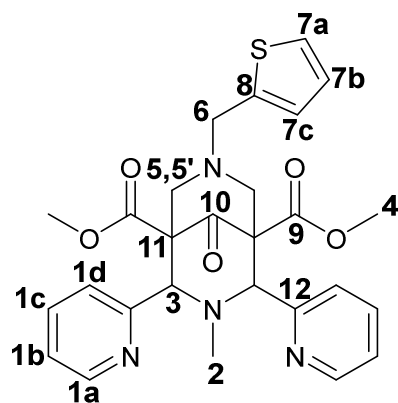
R_f = 0.3-0.5 (SiO₂; DCM/MeOH, 80/20) **¹H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ= 8.80 (d, J= 1.8 Hz, 2H, 1a), 7.94 (dd, J₁= 7.8 Hz, J₂= 1.9 Hz, 2H, 1b), 7.77 (d, J= 7.8 Hz, 2H, 1d), 7.51 (dd, J= 7.6 Hz, 2H, 1c), 5.57 (s, 2H, 3), 4.43 (s, 1H, 12), 3.72 (s, 6H, 4), 3.67 (s, 2H, 6), 3.29 (AB system, δ_A = 3.51, δ_B = 3.06, J_{AB} = 12.3 Hz, ν_A = 1403 Hz, ν_B = 1223 Hz, 4H, 5,5'), 2.32 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeOD): δ= 173.5 (7), 170.6 (8), 153.0 (11), 151.0 (1a), 139.0 (1d), 128.6 (1c/1b), 126.1 (1c/1b), 73.5 (10), 67.1 (3), 56.9 (5,5'), 54.1 (6), 53.3 (4), 43.8 (2). **Mass** ESI/MS (positive mode): *m/z* = 485.20 ([M+H]⁺, 100%), 486.21 ([M+H]⁺, 26.0%), 487.21 ([M+H]⁺, 2.7%).

Ligand L⁶**Formula:** C₂₂H₂₄O₇N₄**Molecular weight:** 456.45 g/mol

L⁵ (86 mg, 0.18 mmol) was solubilized in H₂O/THF (4 mL/4 mL) and sodium hydroxide (43 mg, 1.07 mmol) was added. The mixture was stirred during 4 days. Then, solvent was removed under reduced pressure. The crude product was obtained after purification on column chromatography (reverse phase, H₂O/CH₃CN 100% to 80/20) as a white solid (50 mg, 40%).

Rf = 0.8 (reverse phase, H₂O/CH₃CN 80/20) **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O): δ = 8.61 (dd, J_1 = 5.0 Hz, J_2 = 1.78 Hz, 2H, 1a), 7.72 (dd, J_1 = 7.7 Hz, J_2 = 1.9 Hz, 2H, 1c), 7.39 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 1d), 7.31 (dd, J_1 = 7.4 Hz, J_2 = 5.1 Hz, 2H, 1b), 4.52 (s, 2H, 3), 3.96 (s, 1H, 12), 2.88 (s, 2H, 6), 2.57 (AB system, δ_A = 2.94, δ_B = 2.11, J_{AB} = 12.2 Hz, ν_A = 1177 Hz, ν_B = 845 Hz, 4H, 5,5'), 1.77 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O): δ = 179.0 (8/7), 178.8 (8/7), 159.6 (11), 149.3 (1a/1b/1c/1d), 136.9 (1a/1b/1c/1d), 125.9 (1a/1b/1c/1d), 122.7 (1a/1b/1c/1d), 74.2 (10), 67.5 (3), 65.0 (6), 56.9 (5,5'), 51.8 (9), 42.8 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): m/z = 479.15 ([M+Na]⁺, 100%), 480.16 ([M+Na]⁺, 23.8%). **Elemental analysis** calculated for C₂₂H₂₁O₇N₄Na₃.2NaCl.4H₂O: C, 37.14, H, 4.11, N, 7.88 Found: C, 37.61, H, 4.38, N, 7.52.

Ligand L⁷



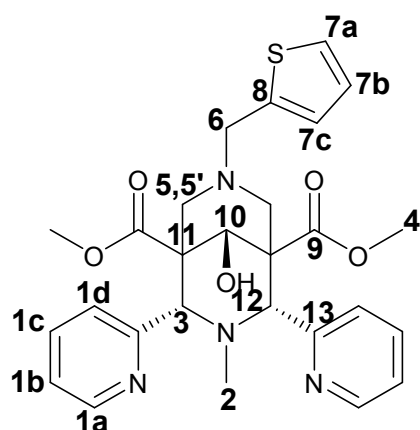
Formula: C₂₇H₂₈O₅N₄S

Molecular weight: 520.60 g/mol

Precursor P₁ (497 mg, 1.30 mmol) was dissolved in warm methanol (6 mL) and formaldehyde (290 μ L, 3.90 mmol) was added at room temperature. After 10 minutes, 2-aminomethylthiophene (147 μ L, 1.43 mmol) was added to the mixture and the reaction was warmed at 55°C during 2h30

under stirring. Slow evaporation gave a precipitate which was filtered and washed with cold methanol. Pure product was obtained without recrystallization (290 mg, 43%).

Rf = 0.8 (Al₂O₃; DCM/MeOH 90:10) **¹H-NMR** (300 MHz, MeOD): δ = 8.45 (d, J = 4.9 Hz, 2H, 1a), 7.98 (d, J = 7.9 Hz, 2H, 1d), 7.59 (t, J = 7.7 Hz, 2H, 1c), 7.38 (d, J = 5.3 Hz, 1H, 7a), 7.16 (dd, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 4.7 Hz, 2H, 1b), 6.97 (dd, J_1 = 5.1 Hz, J_2 = 3.2 Hz, 1H, 7b), 6.88 (d, J = 3.2 Hz, 1H, 7c), 4.72 (s, 2H, 3), 3.83 (s, 6H, 4), 3.57 (s, 2H, 6), 2.82 (AB system, δ_A = 3.06, δ_B = 2.57, J_{AB} = 12.7 Hz, ν_A = 919 Hz, ν_B = 771 Hz, 4H, 5,5'), 2.01 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, MeOD): δ = 203.7 (10), 168.7 (9), 158.7 (12), 149.1 (1a), 139.5 (8), 136.5 (1c), 128.4, (7c), 127.1 (7b), 125.7 (7a), 123.7 (1d), 123.0 (1b), 73.8 (3), 62.2 (11), 58.8 (5,5'), 55.6 (6), 52.7 (4), 43.4 (2). **IR** (cm⁻¹, ATR) ν 1734 (s, C=O ester), 1716 (m, C=O ketone), 1589, 1571 (w, C=C aromatic), 1280 (s, C-O) **Mass ESI/MS** (positive mode): m/z = 521.18 ([M+H]⁺, 100%), 522.19 ([M+H]⁺, 32%), 523.18 ([M+H]⁺, 5.8%). **Elemental analysis** calculated for C₂₇H₂₈O₅N₄S: C, 62.29, H, 5.42, N, 10.76. Found: C, 62.14, H, 5.53, N, 10.98.

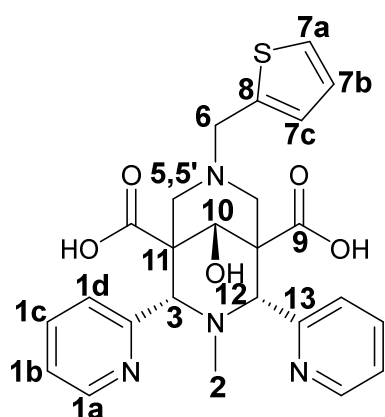
Ligand L⁸

Formula: C₂₇H₃₀O₅N₄S

Molecular weight: 522.62 g/mol

Ligand L⁷ (960 mg, 1.84 mmol) was dissolved in anhydrous methanol (80 mL) and was cooled at -77°C on a bath of acetone/dry ice. Then sodium borohydride (106 mg, 2.77 mmol) was slowly added. After 3h30 at -77°C, a solution of saturated NH₄Cl (20 mL) was added in the flask and the mixture was stirred during 30 minutes. After evaporation of the solvent, a precipitate was obtained with addition of DCM. The mixture was filtered and TFA (150 μL) was added in the filtrate. Solvents were removed under reduced pressure and the obtained solid was purified on a chromatography column (SiO₂; DCM/MeOH 95/5-75/25). Slow evaporation at room temperature gave the enantiopure product, where the pseudo-asymmetric carbon C₁₀ is in the (S) configuration (410 mg, 43%).

R_f = 0.8 (Al₂O₃; DCM/MeOH 90:10) **¹H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ = 8.50 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, 1a), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 1d), 7.77 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, 1c), 7.39 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, 7a), 7.30 (dd, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, 2H, 1b), 7.04 (dd, *J*₁ = 5.3 Hz, *J*₂ = 3.6 Hz, 1H, 7b), 6.99 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, 7c), 5.90 (s, 2H, 3), 4.61 (s, 1H, 10), 3.96 (s, 2H, 6), 3.68 (s, 6H, 4), 3.15 (AB system, δ_A = 3.37, δ_B = 2.93, *J*_{AB} = 12.3 Hz, ν_A = 1348 Hz, ν_B = 1172 Hz, 4H, 5,5'), 2.26 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeOD): δ = 169.4 (9), 152.5 (13), 149.4 (1a), 137.5 (1c/8), 137.5 (1c/8), 128.6 (7c), 128.2 (1d), 127.0 (7b), 126.5 (7a), 124.3 (1b), 73.0 (10), 65.9 (3), 55.0 (6), 54.4 (5,5'), 53.1 (11), 52.4 (4), 42.7 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 523.20 ([M+H]⁺, 100%), 524.21 ([M+H]⁺, 29.2%), 525.20 ([M+H]⁺, 4.5%).

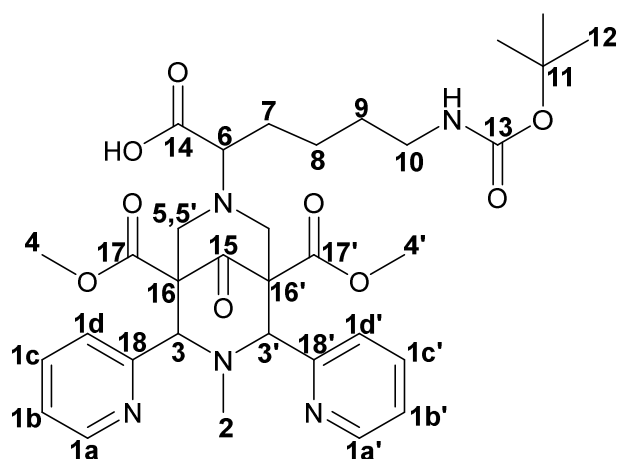
Ligand L⁹

Formula: C₂₅H₂₆O₅N₄S

Molecular weight: 494.56 g/mol

L⁸ (309 mg, 0.59 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (32 mL) and sodium hydroxide (71 mg, 1.78 mmol) in H₂O (12 mL) was added. The solution was stirred at room temperature during 6 days. After evaporation, hydrochloric acid (5 mL, 10 eq.) was added and after 1h, solvent was removed under reduced pressure. Product was purified by filtration on a reverse phase column (100% H₂O then 80:20 H₂O/MeOH). 210 mg of a white powder was obtained (74%).

Rf = 0.74 (reverse phase; H₂O/MeOH 20:80); 0.68 (reverse phase; H₂O/MeOH 30:70) **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O): δ= 8.62 (d, *J*= 3.8 Hz, 2H, 1a), 7.92 (t, *J*= 7.6 Hz, 2H, 1c), 7.72 (d, *J*= 5.2 Hz, 1H, 7a), 7.52-7.40 (m, 5H, 1b+1d+7c), 7.25 (m, 1H, 7b), 4.94 (s, 2H, 3), 4.50 (s, 2H, 6), 4.37 (s, 1H, 10), 3.41 (AB system, δ_A = 3.65, δ_B = 3.16, *J*_{AB} = 12.6 Hz, ν_A = 1459 Hz, ν_B = 1265 Hz, 4H, 5,5'), 1.91 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O, 50°C): δ= 179.1 (9), 161.7 (13), 148.3 (1a), 137.3 (1c, 8), 137.3 (1c, 8), 128.8 (7c), 127.7 (1d), 126.3 (7b), 125.7 (7a), 123.0 (1b), 75.0 (10), 68.7 (3), 56.8 (6), 56.5 (5,5'), 51.7 (11), 43.4 (2). **IR** (cm⁻¹, ATR) ν 3240 (broad, O-H alcool), 3056 (broad, O-H acid), 1710 (m, C=O acid), 1590 (s, C=C aromatic). **Mass ESI/MS** (negative mode): *m/z* = 493.16 ([M+H]⁺, 100%), 494.16 ([M+H]⁺, 27.5%), 495.16 ([M+H]⁺, 4.9%). **Elemental analysis** calculated for 3.[C₂₅H₂₆O₅N₄S].HCl: C, 59.25, H, 5.24, N, 11.06. Found: C, 59.14, H, 5.44, N, 10.81.

Ligand L¹⁰

Formula: C₃₃H₄₃O₉N₅

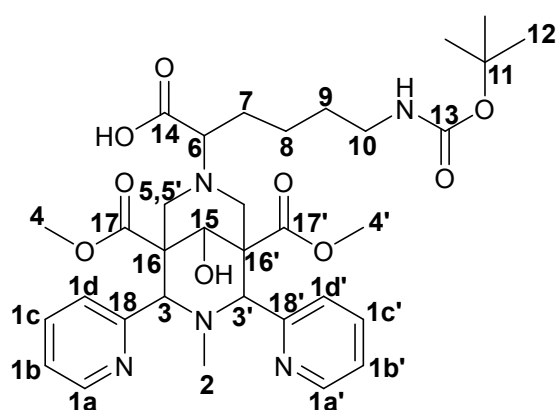
Molecular weight: 653.73 g/mol

In a solution of methanol (60 mL), *N*_ε-Boc-L-lysine (4.19 g, 17.40 mmol) and NaHCO₃ (1.46 g, 17.40 mmol) were mixed under stirring during 1h at 45°C. Then, formaldehyde (3.5 mL, 47.50 mmol) and precursor P₁ (6.06 g, 15.80 mmol) in

methanol (20 mL) were added at room temperature and the mixture was stirred under reflux during 5 h. At the end of the reaction, the solution was filtered and solvents were removed under reduced pressure. The obtained solid was dissolved in a minimum of methanol and was precipitated upon dropwise addition in a large amount of diethyl ether. After centrifugation, precipitates were collected and dried to give a pure beige solid (6.93 g, 67%).

Rf = 0.5 (Al₂O₃; DCM/MeOH, 85/15) **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.95 (m, 2H, 1a+1a'), 7.70 (t, J = 7.6 Hz, 1H, 1c'), 7.59 (t, J = 7.5 Hz, 1H, 1c), 7.35 (m, 1H, 1b'), 7.17 (m, 3H, 1d'+1d+1b), 4.67 (s, 1H, 3), 4.56 (s, 1H, 3'), 3.81 (broad s, 1H, carboxylic acid), 3.77 (s, 3H, 4/4'), 3.66 (s, 3H, 4/4'), 3.22 (AB system, δ_A = 3.60, δ_B = 2.84, J_{AB} = 12.0 Hz, ν_A = 1440 Hz, ν_B = 1136 Hz, 2H, 5/5'), 2.96 (AB system, δ_A = 3.29, δ_B = 2.62, J_{AB} = 12.0 Hz, ν_A = 1316 Hz, ν_B = 1048 Hz, 2H, 5/5'), 2.99 (m, 2H, 10), 2.57 (d, 1H, 6), 1.86 (s, 3H, 2), 1.64-1.22 (m, 15H, 7/8/9/11). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 202.7 (15), 177.0 (14), 168.0 (17/17'), 167.5 (17/17'), 156.1*3 (18+18'+13), 151.5 (1a/1a'), 151.1 (1a/1a'), 137.5 (1c/1c'), 137.0 (1c/1c'), 124.5 (1b/1b'/1d/1d'), 124.2 (1b/1b'/1d/1d'), 124.0 (1b/1b'/1d/1d'), 121.7 (1b/1b'/1d/1d'), 78.7 (11), 74.0 (6), 72.6*2 (3+3'), 63.0*2 (16+16'), 57.5 (5/5'), 54.7 (5/5'), 52.8 (4/4'), 52.5 (4/4'), 43.0 (2), 40.3 (10), 29.9 (7), 28.9 (9), 28.5 (12), 24.0 (8). **IR** (cm⁻¹, ATR) ν 3366 (broad, N-H amide), 2943, 2860 (broad, O-H acid), 1739 (s, C=O ester), 1695 (s, C=O acid), 1572 (s, C=C aromatic), 1254 (s, C-O). **Mass** ESI/MS (positive mode): *m/z* = 654.31 ([M+H]⁺, 100%), 655.31 ([M+H]⁺, 35.7%), 656.32 ([M+H]⁺, 6.2%), 657.32 ([M+H]⁺, 0.7%).

Ligand L¹¹



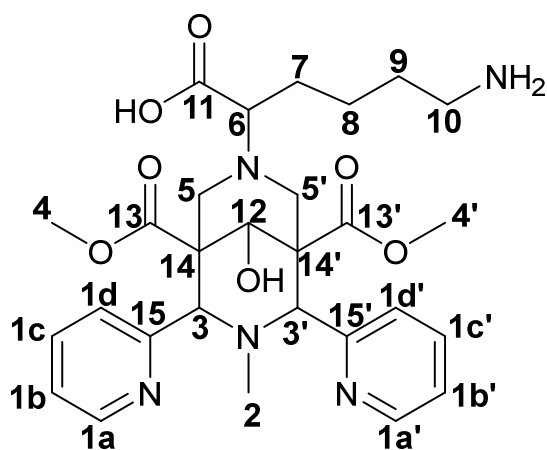
Formula: C₃₃H₄₅O₉N₅

Molecular weight: 655.75 g/mol

Ligand L¹⁰ (3.08 g, 4.71 mmol) was dissolved in anhydrous methanol (110 mL) and was cooled at -77°C on a bath of acetone/dry ice. Then, sodium borohydride (240.00 mg, 7.07 mmol) was slowly added. After 6h at -77°C, the mixture was placed at 4°C for one night. Then NH₄Cl (520.00 mg, 9.72 mmol) was added in the flask and the mixture was stirred during 10 minutes. Solvents were removed under reduced pressure and the obtained solid was purified by flash chromatography column (reverse phase, CH₃CN/H₂O 20/80-25/75). The pure compound L¹⁰.2H₂O was obtained as a white solid (1.10 g, 32%).

R_f = 0.3-0.5 (SiO₂; DCM/MeOH, 80/20) **¹H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ= 8.67 (m, 2H, 1a+1a'), 7.81 (m, 2H, 1c+1c'), 7.60 (m, 2H, 1d+1d'), 7.38 (m, 2H, 1b+1b'), 4.89 (s, 2H, 3+3'), 4.50 (s, 1H, 15), 4.30 (AB system, δ_A = 4.60, δ_B = 4.00, J_{AB} = 12.0 Hz, 2H, 5/5'), 3.96 (AB system, δ_A = 4.10, δ_B = 3.91, J_{AB} = 12.0 Hz, 2H, 5/5'), 3.76 (m, 1H, 6), 3.63 (s, 3H, 4/4'), 3.55 (s, 3H, 4/4'), 3.08 (m, 2H, 10), 2.33-2.17 (m, 2H, 7), 1.73 (m, 4H, 8+9), 1.65 (s, 3H, 2), 1.39 (s, 9H, 12). **¹³C-NMR** (75 MHz, MeOD): δ= 172.7 (14), 170.4 (17+17'), 158.3 (13/18/18'), 157.8 (13/18/18'), 157.7 (13/18/18'), 150.6 (1a/1a'), 150.1 (1a/1a'), 138.1 (1c/1c'), 138.0 (1c/1c'), 128.6*2 (1d+1d'), 124.9 (1b/1b'), 124.8 (1b/1b'), 79.7 (11), 73.8 (15), 72.0 (6), 67.8 (3/3'), 67.5 (3/3'), 56.8 (5/5'), 53.0 (4/4'), 52.9 (4/4'), 52.3*2 (16+16'), 51.2 (5/5'), 41.6 (2), 41.1 (10), 30.7 (9), 30.0 (7), 28.7 (12), 25.1 (8). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 656.33 ([M+H]⁺, 100%), 657.34 ([M+H]⁺, 35.7%), 658.34 ([M+H]⁺, 3.5%). **Elemental analysis** calculated for C₃₃H₄₅O₉N₅·1.5H₂O: C, 58.05, H, 7.09, N, 10.26. Found: C, 57.82, H, 6.81, N, 10.38.

Ligand L¹²



Formula: C₂₈H₃₇O₇N₅

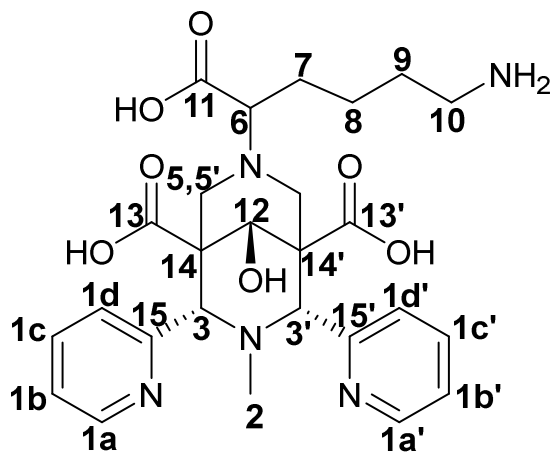
Molecular weight: 555.63 g/mol

Ligand L¹¹ (413.0 mg, 0.74 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (8 mL) and trifluoroacetic acid (2 mL) was added at room temperature under stirring. After 3h, the mixture was evaporated under reduced pressure and the crude TFA salt was used in the next step without purification (413 mg).

R_f = 0.8 (reverse phase; CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA, 50/50) **¹H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ= 8.76 (m, 2H, 1a+1a'), 7.94 (m, 2H, 1c+1c'), 7.77 (m, 2H, 1d+1d'), 7.52 (m, 2H, 1b+1b'), 5.63 (s, 1H, 3/3'), 5.61 (s, 1H, 3/3'), 4.41 (s, 1H, 12), 3.72 (s, 3H, 4/4'), 3.69 (s, 3H, 4/4'), 3.33 (AB system, δ_A = 3.52, δ_B = 3.13, J_{AB} = 12.0 Hz, ν_A = 1408 Hz, ν_B = 1252 Hz, 2H, 5/5'), 3.39 (AB system, δ_A = 3.41, δ_B = 3.38, J_{AB} = 10.5 Hz, ν_A = 1363 Hz, ν_B = 1353 Hz, 1H, 6), 3.13 (m, 2H, 5/5'), 3.03 (t, J = 8.5 Hz, 2H, 10), 2.35-1.92 (m, 2H, 7), 2.31 (s, 3H, 2), 1.90 (m, 2H, 9), 1.61 (m, 2H, 8). **¹³C-NMR** (75 MHz, D₂O): δ= 173.6 (11), 170.5 (13/13'), 170.4 (13/13'), 152.9 (15/15'), 152.8 (15/15'), 151.0 (1a/1a'), 150.4 (1a/1a'), 139.1 (1c/1c'), 139.0 (1c/1c'), 129.0 (1d/1d'), 128.6 (1d/1d'), 126.2 (1b/1b'), 126.1 (1b/1b'), 73.9 (12), 68.1 (6), 67.6 (3/3'), 67.1

(3/3'), 55.8 (5/5'), 54.4 (14/14'), 53.7 (14/14'), 53.3 (4/4'), 53.2 (4/4'), 50.4 (5/5'), 43.4 (2), 40.7 (10), 29.8 (7), 28.8 (9), 25.0 (8).

Ligand L¹³



Formula: C₂₆H₃₃O₇N₅

Molecular weight: 527.58 g/mol

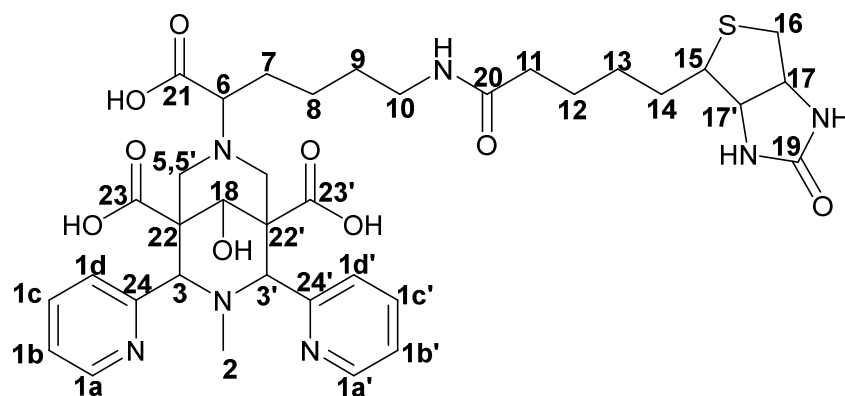
Ligand L¹² (279.0 mg, 0.50 mmol) was dissolved in a mixture of H₂O/THF (8 mL/2 mL) and sodium hydroxide (240.0 mg, 3.0 mmol) was added at room temperature under stirring. After 48h, the mixture was evaporated under reduced pressure and was purified by column

chromatography (reverse phase, 100% H₂O to 100% MeOH in 15 min). The product was isolated as a white sodium salt (265.0 mg, 71%)

R_f = 0.4 (reverse phase; CH₃CN/H₂O, 20/80) **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O): δ= 8.48 (m, 2H, 1a+1a'), 7.54 (m, 2H, 1c+1c'), 7.30 (d, J= 9.0 Hz, 1H, 1d/1d'), 7.19 (m, 1H, 1d/1d'), 7.14 (m, 2H, 1b+1b'), 4.40 (s, 1H, 3/3'), 4.31 (s, 1H, 3/3'), 3.82 (s, 1H, 12), 2.42 (AB system, δ_A = 2.92, δ_B = 1.93, J_{AB} = 12.3 Hz, ν_A = 1167 Hz, ν_B = 774 Hz, 2H, 5/5'), 2.36 (t, J= 6.9 Hz, 2H, 10), 2.29 (AB system, δ_A = 2.75, δ_B = 1.83, J_{AB} = 11.2 Hz, ν_A = 1102 Hz, ν_B = 731 Hz, 2H, 5/5'), 2.20 (m, 1H, 6), 1.51 (s, 3H, 2), 1.47-1.36 (m, 2H, 7), 1.20 (m, 2H, 9), 1.10 (m, 2H, 8). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O): δ= 181.4 (11), 179.1 (13/13'), 178.6 (13/13'), 159.9 (15/15'), 159.3 (15/15'), 149.3, 149.2 (1a+1a'), 137.0*2 (1c+1c'), 126.0 (1d/1d'), 125.5 (1d/1d'), 122.9 (1b/1b'), 122.8 (1b/1b'), 75.3 (6), 74.3 (12), 67.8 (3/3'), 67.1 (3/3'), 55.9 (5/5'), 53.3 (5/5'), 51.7 (14/14'), 51.5 (14/14'), 42.8 (2), 40.2 (10), 32.0 (9), 29.6 (7), 23.0 (8). **IR** (cm⁻¹, ATR) ν 3342 (broad, O-H alcool/N-H amine), 2949 (broad, O-H acid), 1584, 1568 (s, C=C aromatic/ N-H amine), 1366 (s, C-O). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 528.25 ([M+H]⁺, 100%), 529.25 ([M+H]⁺, 28.1%), 530.25 ([M+H]⁺, 3.8%). **Elemental analysis** calculated for C₂₆H₃₁O₇N₅Na₂·3H₂O: C, 49.91, H, 5.96, N, 11.19. Found: C, 49.79, H, 5.92, N, 11.19.

933.45 ($[M+H]^+$, 24.8%). **Elemental analysis:** Elemental analysis calculated for $C_{50}H_{55}BF_2O_8N_7Na_3 \cdot 4NaCl \cdot DMF \cdot H_2O$: C, 48.06, H, 4.87, N, 8.46. Found: C, 47.62, H, 4.93, N, 8.69.

Ligand L¹⁵



Formula: $C_{36}H_{47}O_9N_7S$

Molecular weight:

753.87 g/mol

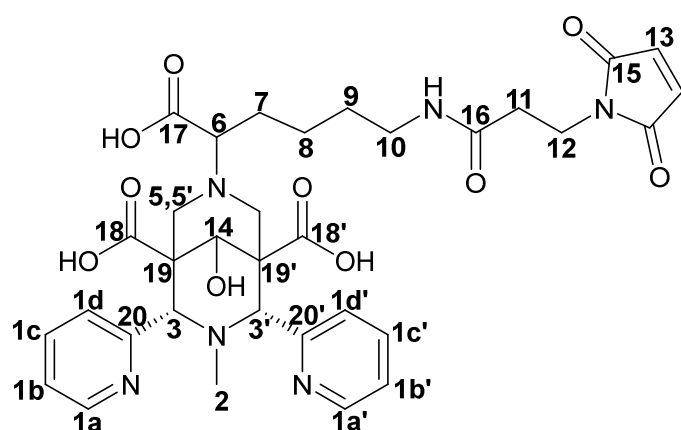
To a solution of L¹³ (75.0 mg, 0.12 mmol) in a minimum amount of H₂O (2 mL),

diisopropylethylamine (600 μ L) was added until pH 12. Then DMF (3 mL) was added and Biotine-NHS (49.0 mg, 0.14 mmol) in DMF (3 mL) was added to the mixture, which was subsequently stirred at room temperature overnight. Solvents were removed under reduced pressure and methanol was added to solubilize the mixture. Diethyl ether was added to precipitate the product and the solid was centrifugated. A first chromatography column (reverse phase, 100% MeOH) was done to remove salts; then a second column (reverse phase, 100% H₂O to 100% MeOH) was realized to obtain pure L¹⁵ as a white sodium salt (45.0 mg, 28%).

R_f = 0.7 (reverse phase; MeOH/H₂O, 90/10) **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O): δ = 8.54 (m, 2H, 1a+1a'), 7.64 (m, 2H, 1c+1c'), 7.36 (d, J= 7.5 Hz, 1H, 1d/1d'), 7.23 (m, 3H, 1b+1b'+1d/1d'), 4.48 (m, 2H, 3/3'+17/17'), 4.39 (s, 1H, 3/3'), 4.31 (s, 1H, 17/17'), 3.87 (s, 1H, 18), 3.21 (m, 1H, 15), 3.07 (m, 2H, 10), 2.69 (AB system, δ_A = 2.82, δ_B = 2.56, J_{AB} = 13.0 Hz, ν_A = 1126 Hz, ν_B = 1023 Hz, 2H, 16), 2.49 (AB system, δ_A = 2.97, δ_B = 2.01, J_{AB} = 11.4 Hz, ν_A = 1188 Hz, ν_B = 803 Hz, 2H, 5/5'), 2.38 (AB system, δ_A = 2.85, δ_B = 1.91, J_{AB} = 11.1 Hz, ν_A = 1139 Hz, ν_B = 764 Hz, 2H, 5/5'), 2.29 (m, 1H, 6), 2.13 (t, J= 7.2 Hz, 1H, 11), 1.66 (s, 3H, 2), 1.62-1.30 (m, 2H, 14/14'), 1.57 (m, 2H, 13), 1.49 (m, 2H, 12), 1.42 (m, 4H, 7+9), 1.20 (m, 2H, 8) **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O): δ = 179.0 (23/23'/21), 178.3 (23/23'/21), 176.6 (23/23'/21), 165 (24/24'/20/19), 160.0 (24/24'/20/19), 159.3 (24/24'/20/19), 149.2*2 (1a+1a'), 136.9*2 (1c+1c'), 126.2 (1d/1d'), 125.6 (1d/1d'), 122.9 (1b/1b'), 122.7 (1b/1b'), 75.0 (6), 74.4 (18), 67.9 (3/3'), 67.1 (3/3'), 62.0 (17/17'), 60.2 (17/17'), 56.0 (5/5'), 55.4 (15), 51.7 (5/5'), 51.5 (22/22'), 48.9 (22/22'), 42.7 (2), 39.6 (16), 39.1 (10), 35.4 (11), 29.4 (7/9), 28.6 (7/9), 27.7

(14/12), 27.6 (14/12), 25.1 (13), 23.3 (8). **IR:** (cm^{-1} , ATR) ν 3262 (broad, O-H alcohol), 3078 (broad, N-H amide), 2934 (broad, O-H acid), 1686 (m, C=O acid), 1590 (s, N-H amide), 1461, 1439 (m, C=C aromatic), 1360 (s, C-O). **Mass ESI/MS** (positive mode): $m/z = 754.32$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%), 755.32 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 38.9%), 756.32 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 4.7%). **Elemental analysis** calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_9\text{N}_7\text{SNa}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: C, 46.59, H, 6.08, N, 10.57. Found: C, 46.87, H, 6.18, N, 10.64.

Ligand L¹⁶



Formula: $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{10}\text{N}_6$

Molecular weight: 678.70 g/mol

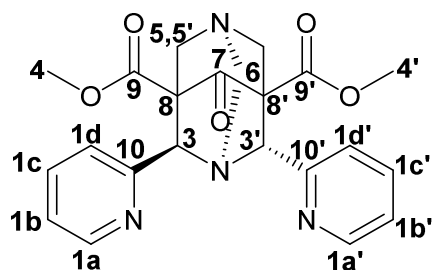
To a solution of NHS-maleimide (34.7 mg, 0.13 mmol) in DMF (10 mL), a mixture of ligand L¹³ (61.7 mg, 0.10 mmol) and N-methylmorpholine (100 μL , 0.10 mmol) in DMF/H₂O

(15 mL/17 mL) was added by aliquots at room temperature under stirring. After 7h, the mixture was evaporated by reduced pressure and was purified under a column chromatography (reverse phase, 100% H₂O to 100% MeOH). The pure product was obtained as a white sodium salt solid (79 mg, 41%)

R_f = 0.8 (reverse phase; CH₃CN/H₂O, 20/80) **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O): δ = 8.64 (m, 2H, 1a+1a'), 7.73 (m, 2H, 1c+1c'), 7.59 (m, 1H, 1d+1d'), 7.19 (m, 1H, 1b+1b'), 6.83 (s, 2H, 13), 4.84 (s, 2H, 3/3'), 4.25 (s, 1H, 14), 4.17 (m, 1H, 5/5'), 3.91 (AB system, $\delta_A = 4.17$, $\delta_B = 3.65$, 2H, 5/5'), 3.78 (t, $J = 7.5$, 2H, 12), 3.65 (AB system, $\delta_A = 3.80$, $\delta_B = 3.49$, 2H, 5/5'), 3.65 (m, 2H, 6), 3.20 (m, 2H, 10), 2.45 (t, $J = 7.0$, 2H, 11), 2.32 (m, 1H, 7/7'), 2.14 (m, 1H, 7/7'), 1.70 (m, 7H, 2/8/9). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O): δ = 175.5 (18/18'/17/15), 173.3 (18/18'/17/15), 172.8 (18/18'/17/15), 172.2 (18/18'/17/15), 167.6 (16), 159.0*2 (20+20'), 150.3 (1a/1a'), 149.9 (1a/1a'), 137.9*2 (1c+1c'), 135.5 (13/13'), 127.8*2 (1d+1d'), 124.3*2 (1b+1b'), 75.0 (14), 70.0 (6), 69.6 (3/3'), 68.3 (3/3'), 57.2 (5/5'), 51.6 (5/5'), 51.0 (19/19'), 49.6 (19/19'), 42.4 (2), 40.3 (10), 35.9 (11), 35.6 (12), 30.3 (9), 29.8 (7), 25.3 (8). **IR:** (cm^{-1} , ATR) ν 3382 (broad, O-H alcohol), 3087 (broad, N-H amide), 2945 (broad, O-H acid), 1704 (s, C=O acid), 1590 (s, N-H amide), 1440 (m, C=C aromatic), 1361 (s, C-O). **Mass ESI/MS** (positive mode): $m/z = 678.26$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%), 679.27 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 35.7%), 680.27 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 6.2%), 701.25 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%).

Elemental analysis calculated for $C_{33}H_{35}O_{10}N_6 \cdot Na_3 \cdot 2H_2O$: C, 50.77, H, 5.04, N, 10.76. Found: C, 50.60, H, 5.46, N, 10.80.

Ligand L¹⁷

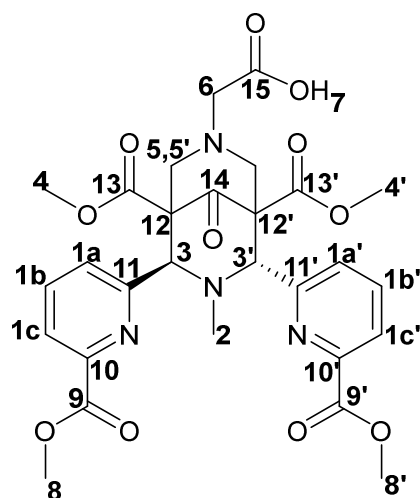


Formula: $C_{22}H_{22}O_5N_4$

Molecular weight: 422.44 g/mol

Precursor P₆ (1 g, 2.71 mmol) was dissolved in methanol (55 mL) and formaldehyde (605 μ L, 8.12 mmol) was added at room temperature. After 10 minutes, ammonium acetate (235 mg, 2.98 mmol) was added to the mixture and the reaction was warmed at 55°C during 6h30 under stirring. Slow evaporation at room temperature gave white crystals which were filtered and washed with cold methanol. Pure product was obtained without recrystallization.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 8.43 (d, J = 4.7 Hz, 1H, 1a), 8.38 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 1a'), 7.86 (td, J_1 = 7.7 Hz, J_2 = 1.9 Hz, 1H, 1c), 7.68 (m, 2H, 1c'/1d), 7.33 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1d'), 7.28 (dd, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 4.7 Hz, 1H, 1b), 7.2 (dd, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 5.0 Hz, 1H, 1b'), 5.33 (s, 1H, 3), 4.76 (s, 1H, 3'), 4.10 (AB system, δ_A = 4.18, δ_B = 3.92, J_{AB} = 13.2 Hz, ν_A = 1674 Hz, ν_B = 1569 Hz, 2H, 6/5/5'), 3.91 (AB system, δ_A = 4.30, δ_B = 3.51, J_{AB} = 13.5 Hz, ν_A = 1721 Hz, ν_B = 1403 Hz, 2H, 6/5/5'), 3.73 (AB system, δ_A = 3.86, δ_B = 3.60, J_{AB} = 12.9 Hz, ν_A = 1544 Hz, ν_B = 1438 Hz, 2H, 6/5/5'), 3.60 (s, 3H, 4/4'), 3.58 (s, 3H, 4/4'). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeOD): δ = 201.7 (7), 172.0 (9/9'), 170.3 (9/9'), 159.8 (10/10'), 158.6 (10/10'), 149.1 (1a'), 148.8 (1a), 138.3 (1c'), 138.1 (1c), 124.7*2 (1d+1d'), 123.9 (1b'), 123.6 (1b), 72.9 (3'), 69.4 (6/5/5'), 65.2 (6/5/5'), 62.6 (3), 59.0 (8/8'), 58.4 (6/5/5'), 58.0 (8/8'), 52.3 (4/4'). **Mass ESI/MS** (positive mode): m/z = 445.15 ($[M+Na]^+$, 100%), 446.15 ($[M+Na]^+$, 23.8%), 447.15 ($[M+Na]^+$, 2.7%).

Ligand L¹⁸

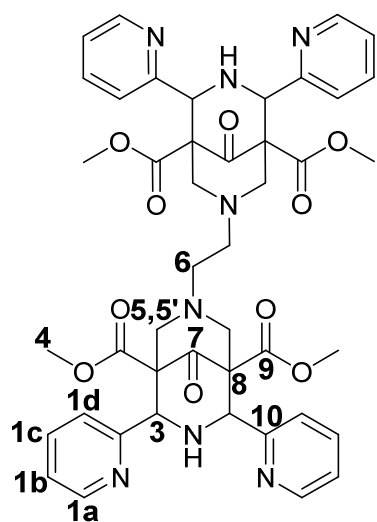
Formula: C₂₈H₃₀O₁₁N₄

Molecular weight: 598.56 g/mol

In a solution of methanol (2 mL), Glycine (34 mg, 0.44 mmol) and NaHCO₃ (38 mg, 0.44 mmol) were mixed under stirring during 1h at 45°C. Then, formaldehyde (89 µL, 1.20 mmol) and precursor P₅ (200 mg, 0.40 mmol) in methanol (4 mL) were added at room temperature and the mixture was stirred under reflux during 3h30. A precipitate was obtained upon slow evaporation of methanol at room

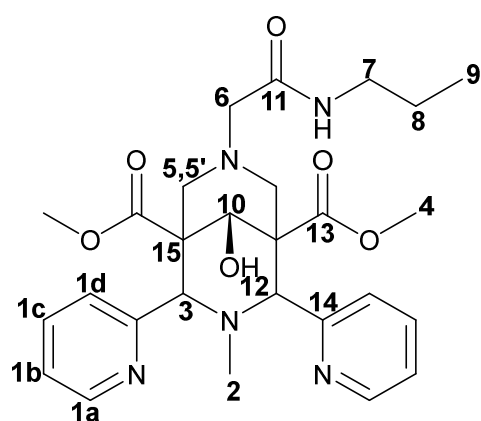
temperature. A white powder was obtained after filtration to give the pure product as a sodium salt in the *trans* configuration (137 mg, 52%).

R_f = 0.1 (SiO₂; DCM/MeOH 90:10) **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ= 8.09 (d, *J*= 7.8 Hz, 1H, 1c), 7.96 (d, *J*= 7.8 Hz, 1H, 1c'), 7.86 (t, *J*= 7.8 Hz, 1H, 1b), 7.77 (t, *J*= 7.8 Hz, 2H, 1b'), 7.60 (d, *J*= 7.8 Hz, 1H, 1a), 7.49 (d, *J*= 7.8 Hz, 1H, 1a'), 5.70 (s, 1H, 3'), 5.26 (s, 1H, 3), 4.08 (s, 3H, 8/8'/4), 3.99 (s, 3H, 8/8'/4), 3.82 (s, 3H, 8/8'/4), 3.67 (AB system, δ_A = 4.34, δ_B = 3.00, *J*_{AB} = 11.6 Hz, ν_A = 1108 Hz, ν_B = 1097 Hz, 2H, 6), 3.37 (s, 3H, 4'), 3.01 (AB system, δ_A = 3.32, δ_B = 2.70, *J*_{AB} = 14.9 Hz, ν_A = 999 Hz, ν_B = 811 Hz, 2H, 5,5'), (AB system, δ_A = 3.00, δ_B = 2.85, *J*_{AB} = 12.4 Hz, ν_A = 899 Hz, ν_B = 858 Hz, 2H, 5,5'), 2.18 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ= 199.4 (14), 174.1 (15), 168.5 (9/9'), 168.1 (9/9'), 165.8 (13/13'), 165.6 (13/13'), 158.4 (10/10'), 158.2 (10/10'), 147.2 (11/11'), 147.1 (11/11'), 139.2 (1b/1b'), 137.0 (1b/1b'), 129.1 (1a/1a'), 128.7 (1a/1a'), 124.6 (1c/1c'), 123.7 (1c/1c'), 73.0 (3'/3), 68.7 (3'/3), 64.7 (6), 64.1 (5/5'), 63.3 (12), 61.6 (5/5'), 61.1 (12'), 53.7 (8), 52.6 (4/4'/8), 52.5 (4/4'/8), 41.0 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 599.19 ([M+H]⁺, 100%), 600.20 ([M+H]⁺, 31.8%), 601.20 ([M+H]⁺, 6.9%). **Elemental analysis** calculated for C₂₈H₂₉O₁₁N₄Na·2H₂O: C, 51.22, H, 5.02, N, 8.53. Found: C, 51.56, H, 4.66, N, 8.62.

Ligand L¹⁹**Formula:** C₄₄H₄₆O₁₀N₈**Molecular weight:** 846.90 g/mol

Precursor P₆ (2.51 g, 6.80 mmol) was dissolved in methanol (120 mL) and formaldehyde (1.52 mL, 20.40 mmol) was added at room temperature. After 10 minutes, N-Boc-1,2-diaminoethane (1.2 g, 7.48 mmol) was added to the mixture and the reaction was warmed at 55°C during 7h under stirring. A white precipitate was obtained after cooling at room temperature. White powder was filtered and washed with cold methanol. Pure secondary product was obtained without recrystallization (75 mg, 3%).

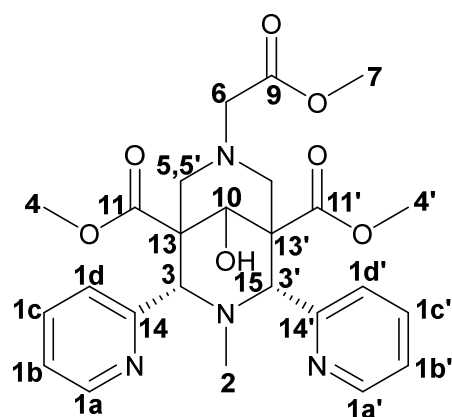
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 8.41 (d, J= 4.9 Hz, 2H, 1a), 7.59 (dd, J₁= 7.9 Hz, J₂= 7.5 Hz, 1H, 1c), 7.40 (d, J= 7.9 Hz, 1H, 1d), 7.12 (dd, J₁= 7.5 Hz, J₂= 4.8 Hz, 1H, 1b), 5.24 (m, 2H, NH), 5.09 (m, 2H, 3), 3.72 (s, 6H, 4), 3.21 (AB system, δ_A = 3.55, δ_B = 2.87, J_{AB} = 12.0 Hz, ν_A = 1417 Hz, ν_B = 1148 Hz, 4H, 5,5'), 2.44 (s, 4H, 6). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ= 204.9 (7), 169.7 (9), 157.2 (10), 148.9 (1a), 136.6 (1c), 123.2 (1d), 122.9 (1b), 66.4 (3), 61.9 (8), 58.5 (5), 54.6 (6), 52.3 (4). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 847.34 ([M+H]⁺, 100%), 848.35 ([M+H]⁺, 47.6%), 849.35 ([M+H]⁺, 11.1%).

Ligand L²⁰**Formula:** C₂₇H₃₅O₇N₅**Molecular weight:** 525.60 g/mol

L⁵ (50 mg, 0.10 mmol), HOBt (15.3 mg, 0.11 mmol), DCC (23.4 mg, 0.11 mmol) and propylamine (25 μL, 0.31 mmol) were added in a flask containing DMF (6 mL) in this order and were stirred at room temperature during 5 days. After evaporation, an extraction with H₂O/Et₂O was made to obtain the crude product in aqueous phase. A purification on SiO₂ column (gradient: DCM/MeOH 90:10 to 70:30) gave 40 mg of pure white powder (74%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD): δ = 8.84 (d, J = 5.2 Hz, 2H, 1a), 7.91 (t, J = 7.8 Hz, 2H, 1c), 7.64 (d, J = 7.9 Hz, 2H, 1d), 7.48 (t, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 5.2 Hz, 2H, 1b), 4.80 (s, 2H, 3), 4.28 (s, 1H, 12), 3.65 (s, 6H, 4), 3.37 (s, 2H, 6), 3.28 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 7), 2.87 (AB system, δ_A = 3.10, δ_B = 2.64, J_{AB} = 12.24 Hz, ν_A = 1329 Hz, ν_B = 1148 Hz, 4H, 5,5'), 1.96 (s, 3H, 2), 1.51 (m, J = 7.2 Hz, 2H, 8), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 9). **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, MeOD): δ = 172.3 (11/13), 171.4 (11/13), 159.4 (14), 151.0 (1a), 139.7 (1c), 128.6 (1d), 125.2 (1b), 73.9 (10), 68.2 (3), 63.6 (6), 56.2 (5,5'), 53.3 (4), 53.0 (4), 46.3 (2), 42.4 (7), 23.4 (8), 11.6 (9).

Ligand L²²

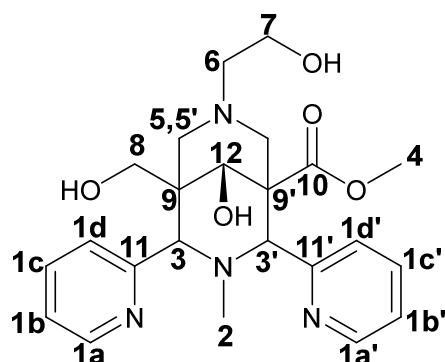


Formula: C₂₅H₃₀O₇N₄

Molecular weight: 498.53 g/mol

Sodium tétrahydroborate (301 mg, 7.96 mmol) was added slowly to a cooled suspension of ligand L¹ (406 mg, 0.80 mmol) in 40 mL of anhydrous methanol. After 30 minutes at 0°C and 4 days at room temperature, the solvent was removed under reduced pressure. Then, ammonium chloride solution was added and the product was extracted with chloroform. After evaporation, the product was purified by FPLC to give the pure product as a white powder (reverse phase, H₂O/CH₃CN (0.1% TFA) 85/15) (94 mg). Yield: 24% (pure).

R_f = 0.3 (reverse phase; H₂O/CH₃CN 0.1% TFA, 60/40) **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.74 (dd, J_1 = 3.8 Hz, J_2 = 4.0 Hz, 2H, 1a+1a'), 8.84 (m, 2H, 1c+1c'), 7.71 (dd, J_1 = 37.8 Hz, J_2 = 7.9 Hz, 2H, 1d+1d'), 7.42 (m, 2H, 1b+1b'), 7.13 (m, 1H, 15), 5.57 (s, 1H, 3/3'), 5.27 (s, 1H, 3/3'), 4.48 (s, 1H, 10), 3.67 (s, 3H, 4/4'), 3.64 (s, 3H, 4/4'), 3.58 (s, 3H, 7), 3.45 (s, 2H, 6), 3.16 (AB system, δ_A = 3.47, δ_B = 2.84, J_{AB} = 12.0 Hz, ν_A = 1009 Hz, ν_B = 851 Hz, 2H, 5,5'), 2.68 (AB system, δ_A = 2.88, δ_B = 2.53, J_{AB} = 12.0 Hz, ν_A = 862 Hz, ν_B = 759 Hz, 2H, 5,5'), 2.34 (s, 3H, 2). **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, CDCl₃): δ = 170.5 (9/9'), 169.7 (9/9') 151.8*2 (11/11'), 150.9*2 (14/14'), 150.0 (1a/1a'), 149.6 (1a/1a'), 138.1 (1c/1c'), 138.0 (1c/1c'), 127.4 (1d/1d'), 125.8 (1d/1d'), 124.8*2 (1b+1b'), 73.1 (10) 66.8 (3/3'), 66.3 (3/3'), 64.3 (6), 56.1 (7), 52.9 (5,5'), 52.3 (5,5'), 52.8 (4/4'), 51.5 (4/4'), 52.6 (13), 43.3 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): m/z = 521.20 ([M+Na]⁺, 100%), 522.20 ([M+Na]⁺, 27%), 523.20 ([M+Na]⁺, 3.5%)

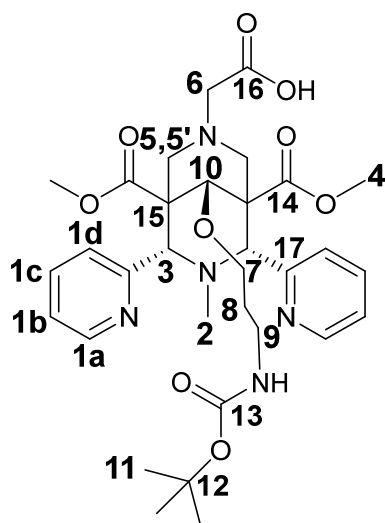
Ligand L²³

Formula: C₂₃H₃₀O₅N₄

Molecular weight: 442.52 g/mol

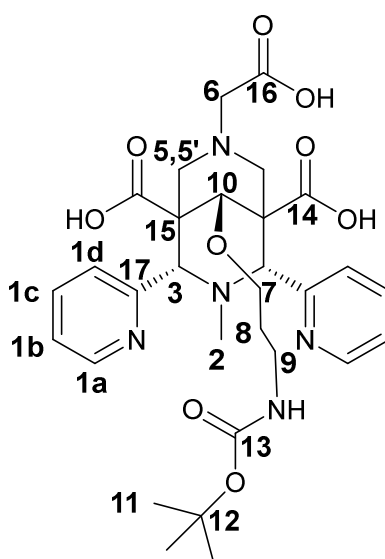
Sodium tetrahydroborate (144 mg, 3.72 mmol) was added slowly to a cooled suspension of ligand L¹ (190 mg, 0.37 mmol) in 22 ml of anhydrous ethanol. After 30 minutes at 0°C and 27h at room temperature, the solvent was removed under reduced pressure. Then ammonium chloride saturated solution was added and stirred during 15 minutes. After evaporation, dichloromethane was added and the mixture was filtered. The filtrate was evaporated and H₂O/0.1% TFA was added before a new evaporation of the mixture. The product was purified by FPLC (SiO₂, 98/2 to 80/20 DCM/MeOH) to give the crude product (164 mg, 24%).

R_f = 0.4 (SiO₂; DCM/MeOH, 80/20) **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ= 8.67 (m, 2H, 1a+1a'), 7.77 (m, 2H, 1c+1c'), 7.64 (d, J= 7.9 Hz, 1H, 1d/1d'), 7.37 (d, J= 7.4 Hz, 1H, 1d/1d'), 7.32 (m, 2H, 1b+1b'), 5.12 (s, 1H, 3/3'), 4.63 (s, 1H, 12), 4.61 (s, 1H, 3/3'), 3.94 (m, 2H, 6), 3.55 (AB system, δ_A = 3.81, δ_B = 3.28, J_{AB} = 12 Hz, ν_A = 1139 Hz, ν_B = 986 Hz, 2H, 5/5'), 3.33 (AB system, δ_A = 3.63, δ_B = 3.03, J_{AB} = 12 Hz, ν_A = 1090 Hz, ν_B = 910 Hz, 2H, 5/5'), 3.29 (AB system, δ_A = 3.87, δ_B = 2.71, J_{AB} = 12 Hz, ν_A = 1162 Hz, ν_B = 813 Hz, 2H, 8), 3.04 (m, 2H, 7), 1.81 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ= 169.3 (10), 155.6 (11/11'), 154.7 (11/11'), 149.8 (1a/1a'), 149.3 (1a/1a'), 138.0 (1c/1c'), 137.4 (1c/1c'), 128.0 (1d/1d'), 126.4 (1d/1d'), 124.2 (1b/1b'), 123.9 (1b/1b'), 69.7 (12), 67.5 (3/3'), 66.5 (3/3'), 61.9 (8), 58.4 (7), 56.1 (6/5/5'), 56.0 (6/5/5'), 54.5 (5/5'), 52.7 (4), 51.5 (9/9'), 43.3 (9/9'), 41.8 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 443.24 ([M+H]⁺, 100%), 465.21 ([M+Na]⁺, 100%)

Ligand L³²**Formula:** C₃₂H₄₃O₉N₅**Molecular weight:** 641.72 g/mol

Ligand L⁵ (350.2 mg, 0.72 mmol) was dissolved in DMF (20 mL) and the mixture was stabilized at 0°C for the addition of NaH (57.8 mg, 1.45 mmol). N-Boc-3-bromopropylamine (206.4 mg, 0.87 mmol) was added and the reaction was placed at room temperature under stirring overnight. Solvents were removed under reduced pressure and extraction with H₂O/Et₂O gave the crude product in the aqueous phase. After evaporation and FPLC purification (reverse phase, H₂O/MeOH 90/10 to 0/100) pure L³² was obtained (122 mg, 26%).

R_f = 0.45 (C18; H₂O/MeOH, 25/75) **¹H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ= 8.71 (d, J= 4.9 Hz, 2H, 1a), 7.78 (t, J= 7.7 Hz, 2H, 1c), 7.55 (d, J= 7.8 Hz, 1H, 1d), 7.35 (m, 2H, 1b), 4.62 (s, 2H, 3), 3.95 (s, 1H, 10), 3.63 (s, 6H, 4), 3.51 (t, J= 5.9 Hz, 2H, 7), 3.27 (t, J= 6.9 Hz, 2H, 9), 2.91 (s, 2H, 6), 2.84 (AB system, δ_A = 3.17, δ_B = 2.51, J_{AB} = 12 Hz, ν_A = 1266 Hz, ν_B = 1001 Hz, 4H, 5/5'), 1.80 (m, 2H, 8), 1.74 (s, 3H, 2), 1.46 (s, 9H, 11). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 1305.60 ([2M+Na]⁺, 100%), 1306.61 ([2M+Na]⁺, 69.2%), 1307.61 ([2M+Na]⁺, 24.2%)

Ligand L³³**Formula:** C₃₀H₃₉O₉N₅**Molecular weight:** 613.67 g/mol

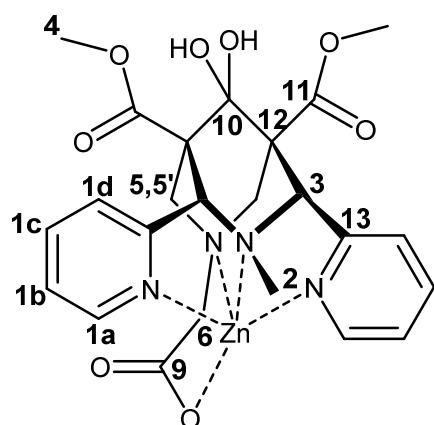
Ligand L³² (115 mg, 0.18 mmol) was dissolved in THF/H₂O 50/50 (10 mL) and NaOH was added (25 mg, 0.63 mmol). The mixture was stirred at room temperature during few days. Solvents were removed under reduced pressure and crude product was purified by FPLC (reverse phase, H₂O/MeOH 100/0 to 0/100) (89 mg, 81%).

R_f = 0.3 (C18; H₂O/MeOH, 80/20) **¹H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ= 8.60 (d, J= 4.9 Hz, 2H, 1a), 7.83 (d, J= 7.5 Hz, 2H, 1d), 7.61 (m, 2H, 1c), 7.18 (m,

2H, 1b), 4.76 (s, 2H, 3), 3.82 (s, 1H, 10), 3.73 (m, 2H, 7), 3.30 (m, 2H, 9), 2.87 (s, 2H, 6), 2.82 (AB system, $\delta_A = 3.02$, $\delta_B = 2.62$, $J_{AB} = 12$ Hz, $\nu_A = 1205$ Hz, $\nu_B = 1045$ Hz, 4H, 5,5'), 1.77 (m, 2H, 8), 1.74 (s, 3H, 2), 1.42 (s, 9H, 11). **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 177.5$ (16), 176.7 (14), 161.9 (13), 157.0 (17), 148.5 (1a), 135.4 (1c), 128.5 (1d), 121.6 (1b), 85.0 (10), 78.2 (12), 72.3 (7), 68.0 (3), 65.8 (6), 58.4*2 (5+5'), 52.1 (15), 42.7 (2), 39.5 (9), 29.9 (8), 27.7 (11) **Mass** ESI/MS (positive mode): $m/z = 614.28$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%), 615.29 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 32.4%), 616.29 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 2.7%)

Preparation of complexes

ZnL^1COOH

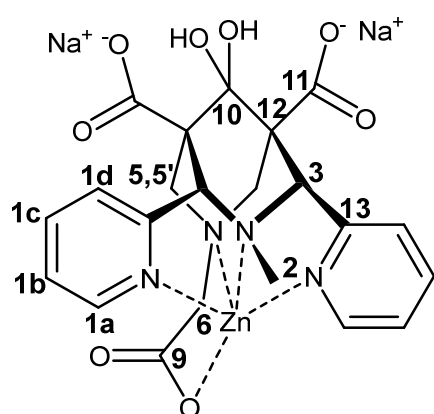


Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_8\text{N}_4\text{Zn}$

Molecular weight: 564.87 g/mol

To a solution of ligand L^1 (306 mg, 0.60 mmol) in THF (20 mL) was added ZnCl_2 (109 mg, 0.78 mmol) dissolved in H_2O (3 mL). The mixture was stirred for 24 h at room temperature and evaporated under reduced pressure. The obtained solid was dissolved in a minimum of H_2O (6 mL) and addition of a great amount of THF (75 mL) resulted in the formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give the complex $\text{ZnL}_2\text{COOH}_1$ (300 mg, 82%).

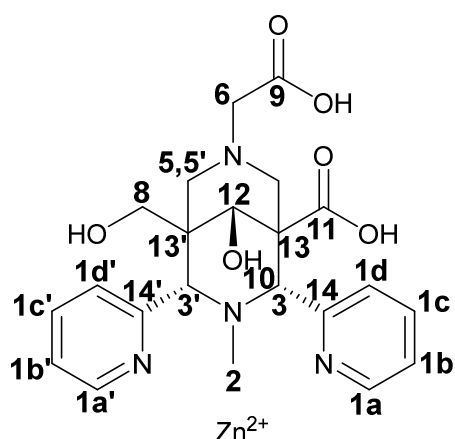
Rf = 0.41 (Al_2O_3 ; DCM/MeOH , 80/20) **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, D_2O): $\delta = 8.67$ (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, 1a), 8.10 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, 1c), 7.70 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, 1b), 7.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, 1d), 5.18 (s, 2H, 3), 3.75 (s, 6H, 4), 3.12 (s, 2H, 6), 2.84 (AB system, $\delta_A = 3.07$, $\delta_B = 2.60$, $J_{AB} = 13.1$ Hz, $\nu_A = 3.075$ Hz, $\nu = 2.605$ Hz, 4H, 5,5'), 2.16 (s, 3H, 2). **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, D_2O): $\delta = 177.4$ (9), 169.8 (11), 152.9 (13), 149.1 (1a/1b/1c/1d), 142.7 (1a/1b/1c/1d), 126.3 (1a/1b/1c/1d), 125.4 (1a/1b/1c/1d), 92.7 (10), 68.1 (3), 61.2 (6), 55.9 (12), 54.1 (5,5'), 53.6 (4), 44.0 (2). **Mass** ESI/MS (positive mode): $m/z = 563.11$ ($[\text{M}]^+$, 100%), 545.10 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 100%), 547.10 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 58%), 549.10 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 42%). **Elemental analysis** calculated for $\text{ZnC}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_8\text{N}_4\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 45.37, H, 4.76, N, 8.82. Found: C, 45.36, H, 4.77, N, 8.81.

ZnL¹(COOH)₃**Formula:** C₂₂H₁₉O₈N₄ZnNa₂**Molecular weight:** 580.78 g/mol

To a solution of ligand ZnL¹(COOH) (299 mg, 0.51 mmol) in H₂O (50 mL) was added NaOH (43 mg, 1.08 mmol). The mixture was stirred for 48 h at room temperature and evaporated under reduced pressure. The obtained solid was dissolved in a minimum of H₂O (5 mL) and addition of a great amount of THF (80 mL) resulted in the formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give the complex ZnL¹(COOH)₃ (275 mg, 74%).

R_f = 1 (reverse phase; H₂O/MeOH, 20/80) **¹H-NMR** (300 MHz, D₂O): δ= 8.64 (d, J= 4.9 Hz, 2H, 1a), 8.06 (t, J= 7.7 Hz, 2H, 1c), 7.64 (t, J= 6.3 Hz, 2H, 1b), 7.58 (d, J= 7.8 Hz, 2H, 1d), 5.03 (s, 2H, 3), 3.05 (s, 2H, 6), 2.60 (AB system, δ_A = 2.89, δ_B = 2.31, J_{AB} = 12.9 Hz, ν_A = 2.885 Hz, ν_B = 2.315 Hz, 4H, 5,5'), 2.11 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, D₂O): δ= 178.2 (9), 174.4 (11), 154.8 (13), 148.3 (1a/1b/1c/1d), 140.8 (1a/1b/1c/1d), 125.9 (1a/1b/1c/1d), 125.6 (1a/1b/1c/1d), 92.8 (10), 69.4 (3), 61.6 (6), 55.8 (12), 55.3 (5,5'), 44.2 (2). **IR** (cm⁻¹, ATR): ν= 3371 (s, νO-H acide), 1600 (s, νC=O acide), 1500-1600 (m, νC=C Ar), 1357 (s, νC-O acide). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 581.04 ([M]⁺, 100%), 583.05 ([M]⁺, 57%), 585.04 ([M]⁺, 39%). **Elemental analysis** calculated for C₂₂H₂₁O₈N₄ZnClNa₂·6H₂O: C, 36.48, H, 4.59, N, 7.73. Found: C, 36.23, H, 4.62, N, 7.58.

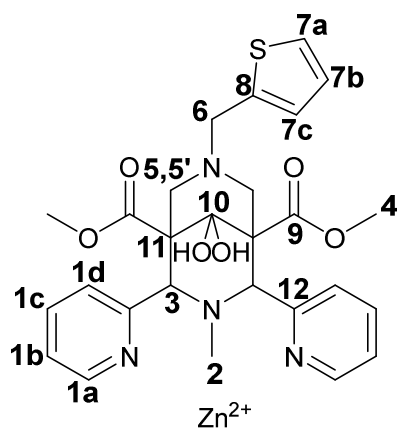
All of the following zinc complexes were prepared in situ in D₂O by mixing stoichiometric amounts of ligand and metal as the zinc chloride salt.

Complex ZnL³

Formula: C₂₂H₂₄O₆N₄Zn²⁺

Molecular weight: 507.84 g/mol

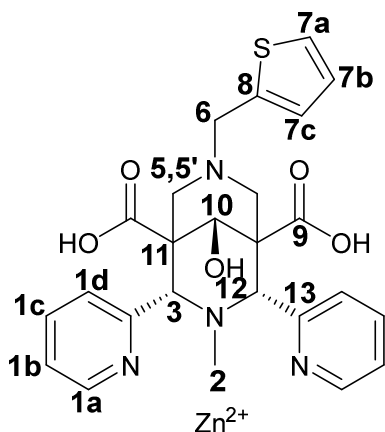
¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ= 8.65 (m, 2H, 1a/1a'), 8.10 (m, 2H, 1c/1c'), 7.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 1d), 7.67 (m, 2H, 1b/1b'), 7.60 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 1d'), 5.04 (s, 1H, 3/3'), 4.45 (s, 1H, 3/3'), 4.36 (s, 1H, 12), 3.45 (AB system, δ_A = 3.72, δ_B = 3.17, *J*_{AB} = 11.4 Hz, ν_A = 1116 Hz, ν_B = 953 Hz, 2H, 6/5,5'), 3.08 (AB system, δ_A = 3.13, δ_B = 3.03, *J*_{AB} = 17.5 Hz, ν_A = 937 Hz, ν_B = 914 Hz, 2H, 6/5,5'), 2.77 (AB system, δ_A = 2.88, δ_B = 2.66, *J*_{AB} = 13 Hz, ν_A = 862 Hz, ν_B = 798 Hz, 2H, 6/5,5'), 2.48 (s, 2H, 8), 2.10 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, D₂O): δ= 177.9 (9), 173.0 (11), 154.3 (14/14'), 154.0 (14/14'), 148.9 (1a/1a'), 148.6 (1a/1a'), 141.0 (1c/1c'), 140.7 (1c/1c'), 126.8 (1d/1d'), 126.4 (1d/1d'), 125.9 (1b/1b'), 69.8 (10), 65.0 (3/3'), 64.0 (3/3'), 62.7 (6), 61.1 (8), 57.3 (5/5'), 57.1 (5/5'), 51.9 (13/13'), 43.9 (13/13'), 42.9 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 505.11 ([ZnM]⁺, 100%), 507.10 ([ZnM]⁺, 57.4%), 509.10 ([ZnM]⁺, 38.6%).

ZnL⁷

Formula: C₂₇H₃₀O₆N₄SZn²⁺

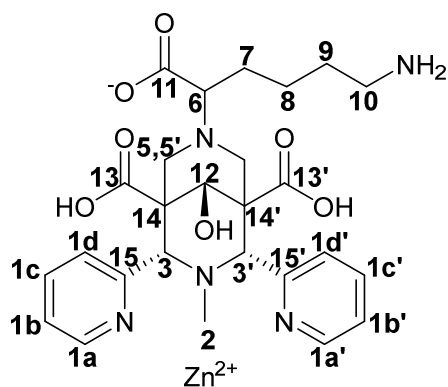
Molecular weight: 603.99 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ= 8.84 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, 1a), 8.18 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, 1c), 7.80 (dd, *J*₁ = 7.7 Hz, *J*₂ = 5.3 Hz, 1H, 1b), 7.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 1d), 7.45 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, 7a), 7.06 (dd, *J*₁ = 5.1 Hz, *J*₂ = 3.3 Hz, 1H, 7b), 6.98 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, 7c), 5.20 (s, 2H, 3), 4.23 (s, 2H, 6), 3.75 (s, 6H, 4), 2.76 (AB system, δ_A = 3.03, δ_B = 2.49, *J*_{AB} = 13.4 Hz, ν_A = 911 Hz, ν_B = 751 Hz, 4H, 5,5'), 2.19 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, D₂O): δ= 169.9 (9), 153.4 (12), 148.9 (1a), 142.1 (1c), 132.0 (7c), 130.6 (8), 128.1 (7a), 127.5 (7b), 126.6 (1b), 126.0 (1d), 92.6 (10), 68.3 (3), 55.5 (6), 55.2 (11), 53.7 (4), 50.0 (5,5'), 45.6 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 637.09 [M+Cl]⁺.

ZnL⁹**Formula:** C₂₅H₂₆O₅N₄SZn²⁺**Molecular weight:** 559.94 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ= 8.62 (d, J= 5.2 Hz, 2H, 1a), 7.92 (t, J= 7.8 Hz, 2H, 1c), 7.72 (d, J= 7.9 Hz, 1H, 1d), 7.52 (t, J₁= 7.4 Hz, J₂= 5.1 Hz, 2H, 1b), 7.45 (d, J= 5.2 Hz, 1H, 7a), 7.06 (t, J₁= 5.2 Hz, J₂= 3.4 Hz, 1H, 7b), 7.02 (d, J= 3.3 Hz, 1H, 7c), 5.06 (s, 2H, 3), 4.25 (s, 2H, 6), 4.22 (s, 1H, 10), 2.79 (AB system, δ_A = 2.89, δ_B = 2.69, J_{AB} = 13.2 Hz, ν_A = 1155 Hz, ν_B = 1082 Hz, 4H, 5,5'), 2.15 (s, 3H, 2). **¹³C-NMR** (75 MHz, D₂O): δ= 172.8 (9), 154.4 (13), 148.5 (1a),

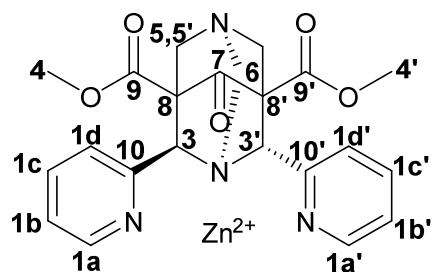
141.4 (1c), 132.1 (7c), 130.8 (8), 128.1 (7b), 127.5 (7a), 127.5 (1d), 126.1 (1b), 71.2 (10), 63.7 (3), 55.7 (6), 53.1 (5,5'), 50.9 (11), 45.1 (2). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z* = 593.05 [M+Cl]⁺.

ZnL¹³**Formula:** C₂₆H₃₂O₇N₅Zn**Molecular weight:** 591.95 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ= 8.55 (dd, J₁= 10.7 Hz, J₂= 4.9 Hz, 2H, 1a/1a'), 7.92 (qd, J₁= 7.9 Hz, J₂= 1.8 Hz, 2H, 1c/1c'), 7.51 (m, 4H, 1d/1d'+1b/1b'), 4.89 (s, 1H, 3/3'), 4.87 (s, 1H, 3/3'), 3.97 (s, 1H, 12), 2.79 (t, J= 7.4 Hz, 2H, 10), 2.67 (dd, J₁= 9.8, J₂= 4.0 Hz, 1H, 6), 2.41

(AB system, δ_A = 2.55, δ_B = 2.26, J_{AB} = 13 Hz, ν_A = 1020 Hz, ν_B = 904 Hz, 2H, 5'/5), 2.34 (AB system, δ_A = 2.41, δ_B = 2.27, J_{AB} = 13 Hz, ν_A = 964 Hz, ν_B = 907 Hz, 2H, 5'/5), 1.96 (s, 3H, 2), 1.48 (m, 3H, 9+7), 1.25 (m, 2H, 7+8), 1.14 (m, 1H, 8). **¹³C-NMR** (75 MHz, D₂O): δ= 180.3 (11), 175.9 (13/13'), 175.7 (13/13'), 155.4 (15/15'), 155.2 (15/15'), 148.2 (1a/1a'), 148.1 (1a/1a'), 140.7 (1c/1c'), 140.6 (1c/1c'), 126.5 (1d/1d'/1b/1b'), 125.7 (1d/1d'/1b/1b'), 125.5 (1d/1d'/1b/1b'), 72.4 (12), 70.4 (6), 65.2 (3/3'), 65.0 (3/3'), 57.2 (5'/5), 51.5 (5'/5), 51.3 (14/14'), 44.1 (2), 39.1 (10), 26.4 (9/7), 25.9 (9/7), 23.7 (8). **Mass ESI/MS** (positive mode): *m/z*

= 590.16 ($[M]^+$, 100%), 592.16 ($[M]^+$, 57.4%), 594.16 ($[M]^+$, 38.6%) ; 626.14 ($[M+Cl+H]^+$, 100%), 628.13 ($[M+Cl+H]^+$, 57.4%), 630.13 ($[M+Cl+H]^+$, 38.6%).

ZnL¹⁷

Formula: C₂₂H₂₂O₅N₄Zn

Molecular weight: 487.82 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 9.28 (d, J = 5.1 Hz, 1H, 1a), 9.05 (d, J = 5.2 Hz, 1H, 1a'), 8.18 (m, 2H, 1c+1c'), 7.75 (m, 2H, 1b+1b'), 7.42 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1d), 7.22 (dd, J =

8.0 Hz, 1H, 1d'), 5.57 (s, 1H, 3), 4.32 (s, 1H, 3'), 4.21 (AB system, δ_A = 4.56, δ_B = 2.85, J_{AB} = 13.0 Hz, ν_A = 1823 Hz, ν_B = 1136 Hz, 2H, 6/5/5'), 3.99 (AB system, δ_A = 4.11, δ_B = 2.86, J_{AB} = 14.0 Hz, ν_A = 1643 Hz, ν_B = 1142 Hz, 2H, 6/5/5'), 3.95 (AB system, δ_A = 4.04, δ_B = 2.86, J_{AB} = 13.0 Hz, ν_A = 1616 Hz, ν_B = 1142 Hz, 2H, 6/5/5'), 3.91 (s, 3H, 4/4'), 3.76 (s, 3H, 4/4'). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeOD): δ = 197.8 (7), 169.5 (9/9'), 169.3 (9/9'), 159.4 (10/10'), 153.6 (10/10'), 152.5 (1a/1a'), 152.2 (1a/1a'), 142.6 (1c/1c'), 142.5 (1c/1c'), 126.9 (1b+1b'), 126.4 (1d/1d'), 125.9 (1d/1d'), 68.6 (3/3'), 64.1 (5/5'/6), 63.5 (3/3'), 58.4 (8/8'), 57.6 (8/8'), 55.3 (5/5'/6), 53.6 (4/4'), 53.4 (4/4').

Crystallographic data

	L¹	ZnL¹(COOH)	L¹⁷
Formula	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₇	C ₂₄ H ₂₇ ClN ₄ O ₈ Zn	C ₂₂ H ₂₂ N ₄ O ₅
Molecular weight (g.mol ⁻¹)	510.54	600.32	422.44
Temperature (K)	173(2)	173(2)	150(2)
Crystal size (mm)	0.30 × 0.25 × 0.20	0.35 × 0.30 × 0.25	0.35 × 0.26 × 0.24
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n
Unit-cell dim. (Å, °)	a= 14.8091(4) b= 11.8613(4) c= 14.8551(4) β = 100.775(2)	a= 9.0749(2) b= 16.9463(4) c= 17.5698(4) β = 106.3810	a= 9.8890(11) b= 20.212(2) c= 10.3832(9) β = 104.147(5)

Volume (Å ³); Z	2563.37(13); 4	2592.31(10); 4	2012.4(3); 4
Density (calc.) (g.cm ⁻³)	1.323	1.538	1.394
Abs. coeff. (mm ⁻¹)	0.097	1.106	0.101
F(000)	1080	1240	888
θ _{max}	27.46	31.98	27.48
Reflections collected	25582	35134	21205
Independent reflections	5860	9008	4572
I>2σ(I) reflections	4496	7992	3582
Parameters	338	348	282
R1, wR2 (I>2σ(I))	0.0566, 0.1418	0.0631, 0.1443	0.0482, 0.1571
R1, wR2 (all data)	0.0832, 0.1555	0.0693, 0.1492	0.0490, 0.1164
Largest diff. peak, hole (e Å ⁻³)	0.359, -0.389		0.204, -0.263

ZnL¹COOH*Metal-coordinating atom distances (Å):*

N ₃ -Zn	2.135
N ₂ -Zn	2.181
N ₄ -Zn	2.159
N ₁ -Zn	2.349
O ₁ -Zn	2.026
Cl-Zn	2.373

Valence angles (°):

N ₁ -Zn-N ₂	91.7
N ₁ -Zn-N ₃	80.3
N ₁ -Zn-N ₄	87.6
N ₂ -Zn-N ₃	77.8
N ₂ -Zn-N ₄	77.8
N ₃ -Zn-N ₄	155.3

Twist angles (°):

N ₄ -C ₁₆ -C ₇ -N ₂	-37.7
N ₃ -C ₁₁ -C ₆ -N ₂	39.7
C ₁₉ -C ₂₀ -N ₄ -Zn	-166.6
C ₁₄ -C ₁₅ -N ₃ -Zn	171.9

Nitrogen distances (Å):

N1...N2	2.923
N3...N4	4.195

Twist angles between pyridine rings (°):

Pyridine 1...pyridine 2	26.81
-------------------------	-------

Pyridine centroids distance (Å):

Pyridine 1...pyridine 2	6.750
-------------------------	-------

Peptide B coupling with ligand L¹⁶

Peptide B (GP 120, Lys-Leu-Thr-Pro-Leu-Cys-Val-Ser-Leu) (30 mmol, solution at 10 µg/µL in H₂O) and ligand L¹⁶ (60 mmol, solution at 10 µg/µL in H₂O) were mixed in a NaHCO₃ solution at 0.1 M and at pH 7.9 for one night at room temperature.

Mass spectrometry

The MALDI-TOF spectra were recorded by the group of Prof. Laurence Sabatier on an Autoflex (Bruker Daltonics), with FlexAnalysis software, on a THAP matrix. This matrix was prepared with a mixture of THAP solution (10 mg/mL) in 50% of CH₃CN and an aqueous solution of ammonium citrate (50 mg/mL) in a 9:1 ratio.

Alkylation of Cysteines

In an Eppendorf, 10 µL of L²⁸, 10 µL of ammonium bicarbonate buffer and 1 µL of iodoacetamide solution (1 µg/µL) were added successively. After one hour, at room temperature, in the dark, a MALDI-TOF spectrum was done on a THAP matrix.

^{99m}Tc-labelling

Labelling reaction with ^{99m}Tc was done in Tris HCl buffer 0.1 M (pH 7.4), by mixing 100 µL of ligand at 5 mg/mL with 10 µL of SnCl₂ solution (2 mg/mL in HCl 0.1 N). Then 500 µL of TcO₄⁻ at 160 MBq was added. After 30 minutes, the mixture was deposited and eluted on a TLC (reverse phase C18, MeOH/H₂O 50/50).

- ¹ Méthodes d'analyses complexométriques avec les Titriplex (Merck E., ed.) Darmstadt **1990**.
- ² Raymond, K. N., Tragic consequence of acetonitrile adduct, *Chem. Eng. News* **1983**, *61*, 4.
- ³ "M86-E01078 APEX2 User Manual", Bruker AXS Inc., Madison, USA, 2006.
- ⁴ Nonius, B. V.; *Kappa CCD Operation Manual*, Ed. ; Delft: The Netherlands, **1997**
- ⁵ Sheldrick, G.M. **1990**, "SHELXS-97 Program for Crystal Structure Determination", *Acta Crystallogr.*, *A46*, 467-473.
- ⁶ Sheldrick, G.; **1999**, "SHELXL-97", Universität Göttingen, Göttingen, Germany.
- ⁷ "M86-E01078 APEX2 User Manual", Bruker AXS Inc., Madison, USA, **2006**.
- ⁸ Spek, A.L. *J. Appl. Cryst.* **2003**, *36*, 7-13.
- ⁹ Gottlieb, H. E.; Kottlyar, K.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *82*, 7512-7515.
- ¹⁰ a) P. Gans and B. O'Sullivan, GLEE[®] 3.0.15, Protonic Softwares 2005, Leeds, U.K. and Berkeley, CA. b) P. Gans and B. O'Sullivan, *Talanta*, **2000**, *51*, 33-37.
- ¹¹ P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, **1996**, *43*, 1739-1753.
- ¹² L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini and A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311.
- ¹³ a) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer and A. D. Zuberbühler, *Talanta*, **1985**, *32*, 95-101. b) F. J. C. Rossoti, H. S. Rossoti and R. J. Whewell, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1971**, *33*, 2051-2065. c) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer and A. D. Zuberbühler, *Talanta*, **1985**, *32*, 257-264. d) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer and A. D. Zuberbühler, *Talanta*, **1986**, *33*, 943-951.
- ¹⁴ a) de Mello, J.C.; Wittmann, H.F.; Friend, R.H. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 230. b) Pålson, L.-O.; Monkman, A.P. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 757. c) Valeur, B. in *Molecular Fluorescence, Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 5th Ed., **2009**, p. 161.

Abréviations

Boc	tert-Butoxycarbonyl
Bodipy	bore-dipyrométhane
CBF	Chélatant BiFonctionnel
CB-TE2A	2,2'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane-4,11-diyl)diacetic acid
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
COSY	Correlation Spectroscopy
DCC	DiCyclohexylCarbodiimide
DCM	DiChloroMéthane
DEPT	Distortionless Enhanced Polarization Transfer
DFT	Density Functional Theory
DMF	Diméthylformamide
DIPEA	DiIsoPropylEthylAmine
DMSO	DiMethylSulfOxide
DOTA	2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid
EDCI	3-(Ethyliminomethylèneamino)- <i>N,N</i> -diméthylpropan-1-amine
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ENH	Electrode Normale à Hydrogène
ESI	ElectroSpray Ionization
FADH	Flavine adénine dinucléotide
FBS	Foetal Bovin Serum
FDG	FluoroDeoxyGlucose
FPLC	Flash Purification Liquid Chromatography
GSH	Glutathion
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
HOBt	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LFMM	Ligand Field Molecular Mechanics
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHS	N-hydroxysuccinimidyl
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SOD	SuperOxide Dismutase
TEMP	Tomographie d'Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par Emission de Positrons
TFA	TriFluoroAcetic acid
THF	TetraHydroFuran
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	UltraViolet

Publications et communications

Publications :

1. *Substitution assisted stereochemical control of bispidine-based ligands*, Legdali T., Roux A., Platas-Iglesias C., Camerel F., Nonat A.M. and Charbonnière L.J., *Journal of Organic Chemistry*, 2012, 77, 11167–11176
2. *Kinetically inert bispidine-based Cu(II) chelate for ^{64/67}Cu nuclear medicine and diagnosis*, Roux A., Nonat A.M., Brandel J., Hubscher V. and Charbonnière L.J., *manuscript en préparation*

Communications orales :

Nouveaux ligands de type bispidine: vers des complexes de Cu(II) cinétiquement inertes pour la médecine nucléaire et le diagnostic

A. Roux, A. Nonat, J. Brandel, V. Hubscher et L. J. Charbonnière, Journées de Chimie de Coordination 2014 de la Société Chimique de France, 30-31 Janvier 2014, Rennes

Synthesis and physico-chemical studies of new bifunctional bispidine-based chelates for ⁶⁴Cu-PET applications

A. Roux, A. Nonat, J. Brandel, V. Hubscher et L. J. Charbonnière, Journées des Doctorants de Chimie 2013, 19 Novembre 2013, Strasbourg

Communications par affiche :

New bifunctional bispidines for immuno-TEP and optical bimodal imaging

A. Roux, A. Nonat, J. Brandel, V. Hubscher, C. Goze et L.J. Charbonnière, 5èmes rencontres du Groupe d'étude en chimie des Polyamines cycliques et linéaires (GEPOL 2014), 23-25 Juin 2014, Kligenthal

Bispidine-based molecules as ligands for ⁶⁴Cu-PET imaging: synthesis, complexation, coupling and physicochemical studies

A. Roux, A. Nonat, J. Brandel, V. Hubscher et L.J. Charbonnière, International Conference on Bioinorganic Chemistry (ICBIC 16), 22-26 Juillet 2013, Grenoble

Synthèse et structure de chélatants bifonctionnels du ⁶⁴Cu en vue d'applications en tomographie par émission de positrons

A. Roux, T. Legdali, A. Nonat et L. J. Charbonnière, Gecom-concoord 2012, 3-8 Juin 2012, Metabief-Mont d'or

Synthèse de ligands bifonctionnels pour la complexation du ⁶⁴Cu en vue d'applications en imagerie médicale par Tomographie par Emission de Positron

A. Roux, T. Legdali, A. Nonat et L. J. Charbonnière, Journées de Chimie de Coordination 2012 de la Société Chimique de France, 26-27 Janvier 2012, Strasbourg

Synthèse et fonctionnalisation de ligands de type bispidine pour la complexation du ^{64}Cu en vue d'applications en imagerie médicale par Tomographie par Emission de Positrons et en radiothérapie

Résumé :

Ce travail de thèse visait à développer une nouvelle famille de ligands de type bispidines pour la complexation du cuivre(II) en vue d'applications en tomographie par émission de positrons (TEP). En effet, le cuivre 64 est un radioélément dont l'étude dans le cadre de l'imagerie TEP est en plein essor. Les bispidines, quant à elles, présentent l'intérêt de posséder une structure rigide et pré-organisée permettant la complexation de nombreux métaux de transitions.

Nous présentons ici la synthèse et l'optimisation de nouveaux ligands dont les propriétés structurales et physico-chimiques ont été étudiées. Un ligand a montré de très bons résultats puisqu'il possède tous les paramètres cinétiques et thermodynamiques nécessaires à un chélatant utilisé en imagerie TEP.

Différentes voies de fonctionnalisation ont ensuite été étudiées afin d'obtenir divers chélatants bifonctionnels. Un ligand comportant une lysine a pu être couplé à une fonction maléimide (régiosélective des cystéines), à une biotine (possédant une forte interaction pour la streptavidine) ou encore à un motif Bodipy pour l'obtention d'une sonde bimodale (UV-visible et TEP).

Enfin, nous présentons l'extension de cette famille de bispidines par l'augmentation du nombre de fonctions de coordination présentes ou encore par l'obtention de ligands tricycliques en vue de moduler la sélectivité de ces molécules.

Mots-clés : bispidines, cuivre(II), TEP, chélatant bifonctionnel

Abstract:

This work aimed to develop a new family of bispidine-type ligands for copper(II) complexation with applications in Positron Emission Tomography (PET). Indeed, copper 64 is a radioelement whose study in PET imaging is booming. Bispidines have the benefit of having a rigid and pre-organized structure for complexation of a large number of transition metals.

In this work we present the synthesis and optimization of new ligands whose structural and physico-chemical properties have been studied. One ligand showed very good results because it possesses all of kinetic and thermodynamic parameters which are necessary for its application to PET imaging.

Different strategies of functionalization have been studied to obtain bifunctional chelates. A lysine derivative has been coupled to a maleimide function (regioselective of cysteines), to a biotine (which displays a strong affinity for streptavidin) or to a Bodipy pattern for obtaining a bimodal probe (UV-visible and PET).

Finally, we present an extension of this bispidine family by increasing the number of coordination functions or by synthesizing tricyclic compounds to modulate the selectivity of these molecules.

Key-words: bispidines, copper(II), PET, bifunctional chelate